



Strategien zur Inhibierung der HIV-Reaktivierung in latent infizierten
Astrozyten

Christine Kunze

Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

München, 03.05.2017

Strategien zur Inhibierung der HIV-Reaktivierung in latent infizierten Astrozyten

Dissertation an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

Durchgeführt am Institut für Virologie des Helmholtz Zentrums München
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt

Vorgelegt von M.Sc. Christine Kunze

Gutachter: Prof. Dr. Ruth Brack-Werner
Prof. Dr. Benedikt Grothe

Tag der Abgabe: 03.05.2017

Tag der mündlichen Prüfung: 05.12.2017

Für meine Eltern und meinen Bruder

Für meinen Ehemann Andreas

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Humanes Immundefizienz Virus (HIV)	1
1.1.1	HIV–Pandemie	1
1.1.2	Aufbau des HI-Virus	3
1.1.2.1	Genomaufbau	3
1.1.2.2	Virusaufbau	5
1.1.3	Aktiver HIV-Replikationszyklus	6
1.1.4	Behandlung von HIV-Infektionen durch cART (<i>engl.</i> combined anti-retroviral therapy)	9
1.1.5	HIV Latenz und HIV Reservoir	10
1.1.5.1	HIV im zentralen Nervensystem (ZNS)	11
1.1.5.2	Strategien zur Behandlung von HIV Reservoir	14
1.2	Adeno-assoziierte Viren (AAVs)	16
1.2.1	Genom- und Virusaufbau	16
1.2.2	Replikationszyklus	18
1.2.3	AAVs als virale Vektoren	20
1.2.3.1	Vergleich von AAVs mit anderen viralen Vektoren	21
1.2.3.2	Kapsidmodifikationen	22
1.3	Genomeditierung zur Inhibierung der HIV Replikation	22
1.3.1	Vergleich verschiedener Genomeditierungssysteme	23
1.3.2	Genomeditierung durch CRISPR/Cas9	24
1.4	Zielsetzung der Arbeit	27
2	Material und Methoden	28
2.1	Materialien	28
2.1.1	Medien	28
2.1.2	Kits	29
2.1.3	Oligonukleotide	29
2.1.4	gRNAs	31
2.1.5	Plasmide	31
2.1.6	Prokaryotische Zellen	36
2.1.7	Humane Zellen	36
2.1.8	Antikörper	38
2.1.9	Software und Online Tools	39
2.2	Zellbiologische Methoden	39

2.2.1	Auftauen und Einfrieren von humanen Zellen	39
2.2.2	Kultivierung und Aussaat von humanen Zellen	40
2.2.3	Kultivierung, Aussaat und Differenzierung von HNSC.100 und HNSC.LatGFP1.2	41
2.2.4	Transfektion von Plasmiden mit X-tremeGENE (Roche)	41
2.2.5	Transduktion von Zellen/Organoiden mit viralen Vektoren	41
2.2.6	Produktion von Adeno-assoziierten Vektoren	42
2.2.7	gRNA Screening	44
2.2.8	Quantifizierung von Gag-p24 Mengen	45
2.2.9	Immunfluoreszenzfärbung von humanen Zellen	46
2.2.10	Immunfluoreszenzfärbung von Organoiden	47
2.2.11	Mikroskopie-Analyse	48
2.2.12	FACS Canto II Analyse und Auswertung	48
2.3	Molekularbiologische Methoden	49
2.3.1	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	49
2.3.2	Restriktionsverdau	51
2.3.3	Agarose-Gelelektrophorese	51
2.3.4	Aufreinigung von DNA mittels NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit	52
2.3.5	Ligation	52
2.3.6	Transformation von <i>E. coli</i>	53
2.3.7	Isolierung von Plasmid DNA	53
2.3.8	Photometrische DNA/RNA-Quantifizierung	54
2.3.9	Sanger Sequenzierung	54
2.3.10	T7 Assay	54
2.3.11	Isolierung genomischer DNA (gDNA)	56
2.3.12	Isolierung zellulärer RNA	57
2.3.13	Reverse Transkription	57
2.3.14	Quantitative PCR (qPCR)	57
2.3.15	Erstellen einer MiSeq Bibliothek	60
2.4	Statistische Auswertung	63
3	Ergebnisse	65
3.1	Identifizierung eines AAV Vektors für die Transduktion von Astrozyten und neuronalen Progenitorzellen	65
3.1.1	Screening einer AAV Bibliothek zur Identifizierung eines AAV Vektors für die Transduktion von HNSC.100 Zellen	65
3.1.2	Zellspezifität von AAV9P1 in verschiedenen Zelllinien des ZNS	67

3.1.3	Transduktion von hiPSC-abgeleiteten ZNS Zellen durch AAV9P1	69
3.1.4	Transduktion von humanen Organoiden durch AAV9P1	71
3.2	Untersuchung und Optimierung des Transduktionsverhaltens von AAV9P1	74
3.2.1	Transduktionsverhalten von AAV9P1 in verschiedenen Zelltypen	74
3.2.2	Erhöhung der Spezifität durch zellspezifische Promotoren	75
3.2.2.1	Das Nes714 Promotorkonstrukt.....	75
3.2.2.2	Der gfaABC ₁ D Promotor.....	77
3.3	Analyse der Langzeit-Transduktion von HNSC.100 Zellen durch AAV9P1	80
3.4	Inhibierung der HIV Expression in persistent infizierten Astrozyten durch AAV9P1 vermittelte Transgene.....	85
3.4.1	AAV9P1 vermittelte Überexpression des HIV Restriktionsfaktors 16.4.1	85
3.4.2	Inhibierung der HIV Expression durch den Einsatz von CRISPR/Cas9.....	86
3.4.2.1	Guide RNA Design und Klonierung verschiedener CRISPR/Cas9 Konstrukte	87
3.4.2.2	Etablierung eines gRNA Screening Systems.....	89
3.4.2.3	Identifizierung von potenten Promotor-gRNA Kombinationen.....	92
3.4.2.4	Effekte auf HIV-1 Expression in HNSC.LatGFP1.2 Kulturen nach der Transduktion mit AAV9P1_CRISPR/Cas9.....	97
3.4.2.5	Effekte auf HIV-1 Proviren in HNSC.LatGFP1.2 Kulturen nach der Transduktion mit AAV9P1_CRISPR/Cas9.....	98
4	Diskussion	102
4.1	Identifizierung von AAV9P1 für die Transduktion von Astrozyten und neuronalen Progenitorzellen	102
4.2	Transduktionseigenschaften von AAV9P1	104
4.2.1	Analyse der Zellspezifität von AAV9P1	104
4.2.2	Strategien zur Erhöhung der Zellspezifität	105
4.2.3	Analyse der Langzeittransduktion von HNSC.100 Zellen durch AAV9P1	108
4.3	Inhibierung der HIV Expression in persistent infizierten Astrozyten	110
4.3.1	Überexpression des zellulären Restriktionsfaktors 16.4.1 nach AAV9P1 vermittelter Transduktion	110
4.3.2	Verwendung von CRISPR/Cas9 zur Inaktivierung von latenten HIV Proviren in Astrozyten	111
4.3.2.1	Design und Identifizierung von potenten gRNAs	112
4.3.2.2	Einführung von inhibierenden Mutationen in astrozytären Proviren durch den Einsatz von AAV9P1-CRISPR/Cas9	114
5	Zusammenfassung und Ausblick	116
6	Anhang	117

6.1	Puffer	117
6.2	Chemikalien und Enzyme	118
6.3	Verbrauchsmaterialien	121
6.4	Geräte	122
6.5	Plasmidkarten	123
6.6	Protokolle zur Herstellung von hiPSCs und davon abgeleiteten Zellen	125
6.7	Protokoll zur Isolierung von PBMCs	127
7	Abkürzungen	128
8	Referenzen	132
9	Danksagung	144
10	Lebenslauf	145
11	Veröffentlichungen	146
12	Eidesstattliche Erklärung	147

1 Einleitung

1.1 Humanes Immundefizienz Virus (HIV)

Bereits im Jahr 1981 beschrieben Gottlieb *et al.* erste Fälle von zuvor gesunden Männern, die eine Reihe von Infektionen aufwiesen, welche bis dahin nur bei immunsupprimierten Patienten diagnostiziert wurden [1]. Darunter waren Infektionen mit CMV (Cytomegalovirus) und *Pneumocytis jirovecii* (Lungenentzündung), einige Patienten entwickelten auch Kaposi Sarkome. Bereits in dieser Phase wurde eine starke Verringerung der T-Lymphozyten festgestellt und es wurde die Vermutung eines erworbenen T-Zell Defekts aufgestellt [1]. Dies waren die ersten beschriebenen Fälle von AIDS (*engl.* Acquired Immunodeficiency Syndrome) Patienten. Bald darauf wurde festgestellt, dass sich die Krankheit über sexuellen Kontakt und Blut bzw. Blutprodukte verbreitet und es wurde vermutet, dass es sich um eine virale Erkrankung handelt. Im Jahr 1983 isolierten zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander den Erreger von AIDS, ein Retrovirus, das aufgrund seiner Ähnlichkeit zu HTLV-I und -II (Humanes T-Zell Leukämie Virus 1 und 2) als HTLV-III bezeichnet wurde [2,3]. Im Jahr 1986 wurde dann der bis heute gültige Name Humanes Immundefizienz Virus (HIV oder HI-Virus) festgelegt [4].

1.1.1 HIV–Pandemie

Ende 2015 waren laut WHO 36,7 Millionen Menschen weltweit mit HIV infiziert, in selben Jahr kam es zu 1,1 Millionen AIDS-assoziierten Todesfällen (<http://www.who.int/gho/hiv/en/>; 10.04.2017). Anhand der Karte in Abbildung 1 ist zu sehen, dass die meisten HIV Infektionen in afrikanischen Ländern, vor allem in Ländern südlich der Sahara, zu finden sind. Allerdings gibt es keinen Teil der Erde, indem keine HIV Infektionen auftreten, was diese Viruserkrankung zu einer Pandemie macht.

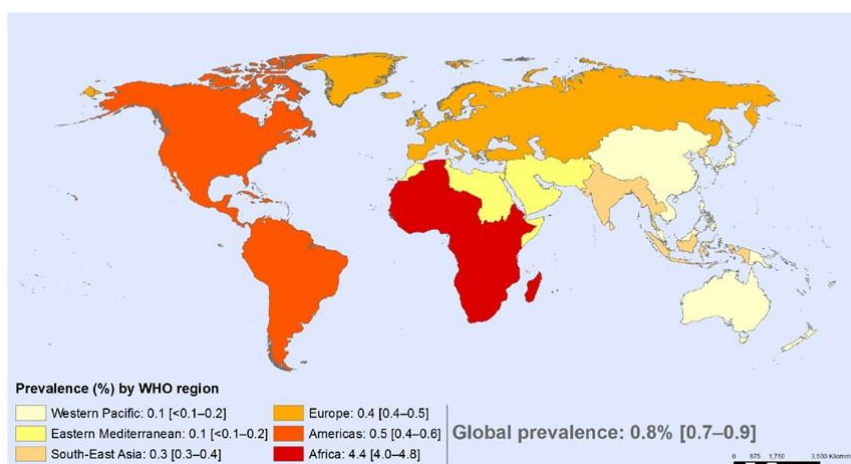


Abbildung 1: Globale Verbreitung von HIV in 2015. (<http://www.who.int/gho/hiv/en/>;

10.04.17)

HIV lässt sich in zwei verschiedene Typen unterteilen, HIV-1 und HIV-2. Obwohl die beiden Typen die gleiche Transmission und den gleichen Krankheitsverlauf aufweisen, beruht die HIV Pandemie auf dem Typ HIV-1. Infektionen mit HIV-2 sind fast ausschließlich auf Westafrika begrenzt und verlaufen in der Regel milder als HIV-1 Infektionen [5]. HIV-1 entstand durch die zoonotische Übertragung von Lentiviren aus Schimpansen (=SIV, Simianes Immundefizienzvirus) auf den Menschen [6–8]. HIV-1 kann des Weiteren in verschiedene Gruppen unterteilt werden (Abbildung 2). Die Gruppe M (= „Major“ Gruppe) stellt hierbei die eigentlich pandemische Gruppe dar, während die Gruppen N und O auf Regionen in Kamerun und Westafrika beschränkt sind [9,10]. Die Gruppe P wurde in Kamerun gefunden und entstand durch eine Zoonose aus Gorillas [11].

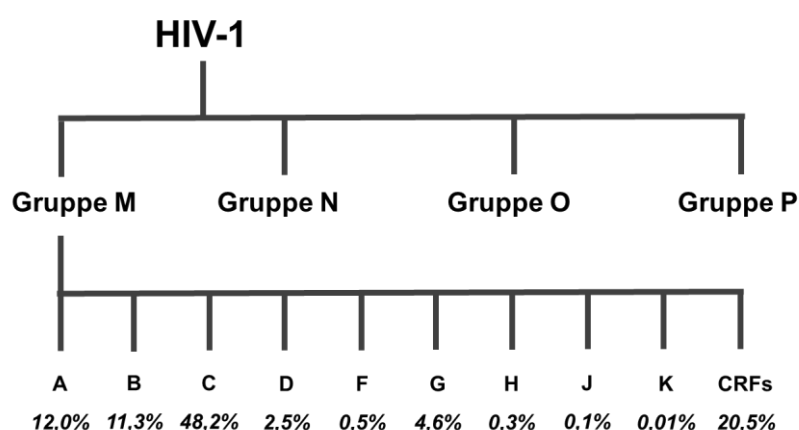


Abbildung 2: Klassifizierung von HIV. HIV-1 wird in die Gruppen M, N, O und P eingeteilt. Die pandemische Gruppe M unterteilt sich in die Subtypen A, B, C, D, F, G, H, J, K. CRFs (*engl.* circulating recombinant forms) sind Rekombinanten aus unterschiedlichen HIV Subtypen. Prozentzahlen entsprechen der weltweiten Häufigkeit eines Subtyps (Stand 2004-2007) und stammen aus Hemelaar *et al.*, 2011 [12].

Die Gruppe M des HIV-1 Typs kann in neun verschiedene Subtypen (A-D, F, G, H, J, K) aufgeteilt werden. Die Einteilung erfolgt hierbei aufgrund von Sequenzähnlichkeiten. Zudem tauchen immer wieder sogenannte „circulating recombinant forms (CRFs) auf, die Rekombinanten aus zwei unterschiedlichen Subtypen darstellen. Zwischen 2004 und 2007 stellten CRFs bereits 20,5% der HIV-1 Gruppe M Infektionen dar. Subtyp C ist mit einer weltweiten Verbreitung von 48,2% der häufigste HIV-1 Subtyp und findet sich in Afrika wieder. Der Subtyp B ist am weitesten in Europa und auf dem amerikanischen Kontinent verbreitet, während der Subtyp A häufig in Zentralasien gefunden wird [10,12].

1.1.2 Aufbau des HI-Virus

HIV gehört zur Virusfamilie der Retroviren und darin zum Genus der Lentiviren. Neben HIV als humanen Vertreter der Lentiviren, gibt es noch eine Vielzahl anderer Lentiviren, z.B. SIV (Affenimmundefizienzvirus), FIV (felines Immundefizienzvirus), BIV (bovines Immundefizienzvirus) und andere. Retroviruspartikel enthalten zwei einzelsträngige RNA Genome mit positiver Polarität. Das RNA Genom wird nach Infektion einer Wirtszelle mit Hilfe des viralen Enzyms Reverse Transkriptase in ein doppelsträngiges DNA Genom umgeschrieben. Das virale Genom wird anschließend in das Genom der Wirtszelle integriert (=Provirus) und dient als Vorlage für sämtliche zur Replikation benötigten viralen Genprodukte [13]. Im Folgenden wird der genaue Aufbau des HI-Virus und dessen Genoms beschrieben.

1.1.2.1 Genomaufbau

Im Viruspartikel selbst liegt das virale Genom als einzelsträngiges RNA Molekül vor (1.1.2.2) Es ist an seinem 5' Ende gecappt und am 3' Ende polyadenyliert, wodurch es einer eukaryotischen mRNA gleicht. [14].

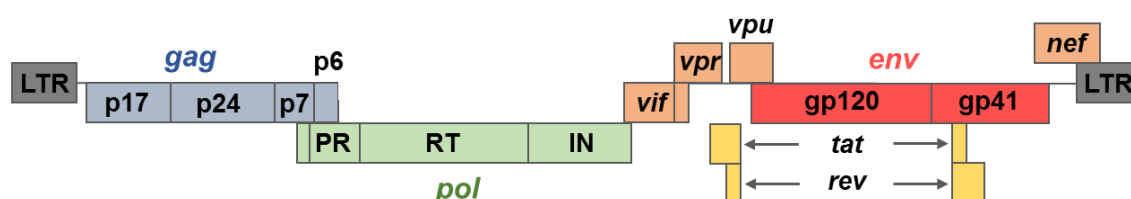


Abbildung 3: Schematischer Aufbau des HIV Provirus. Flankiert werden die neun Leseraster von zwei LTR Sequenzen. Der Leseraster für Gag (blau) enthält kodierende Sequenzen für die Proteine p17, p24, p7 und p6. Pol (grün) kodiert für die viralen Enzyme (PR = Protease, RT = Reverse Transkriptase, IN = Integrase). Env (rot) enthält Sequenzen für die beiden Glykoproteine gp120 und gp41. Zusätzlich existieren Leseraster für die akzessorischen Proteine Vif, Vpr, Vpu und Nef und für die regulatorischen Proteine Tat und Rev.

Der HIV Provirus umfasst ca. 9700 Basenpaare und besteht aus neun Leseraster für Protein-kodierende Sequenzen (Abbildung 3). Diese Leseraster kodieren für die Strukturproteine Gag (Gruppenspezifische Antigene), für Pol (virale Enzyme) und Env (Hüllproteine). Außerdem existieren Leseraster für die akzessorischen Proteine Vif, Vpr, Vpu und Nef und für die regulatorischen Proteine Tat und Rev. Während der Transkription des Provirus entstehen durch die vier Spleißdonor- und acht Spleißakzeptorstellen insgesamt über 40 HIV mRNA Spezies. Ungespleißte mRNAs bilden die Grundlage für die

Translation der Gag und der Gag-Pol Proteine oder dienen als neu synthetisierte HIV RNA Genome, während vollständig gespleißte mRNAs für die Translation der Proteine Tat, Rev und Nef benötigt werden. Die restlichen HIV Proteine (Env, Vif, Vpr, Vpu) werden von unvollständig gespleißten mRNAs translatiert [15,16].

Der Provirus wird von zwei LTR (*engl.* long terminal repeat) Sequenzen flankiert, die in gleicher Orientierung vorliegen. Beide LTRs werden in die Abschnitte U3, R und U5 unterteilt, wobei der 5' LTR als Promotor für die Transkription aller HIV mRNAs dient.

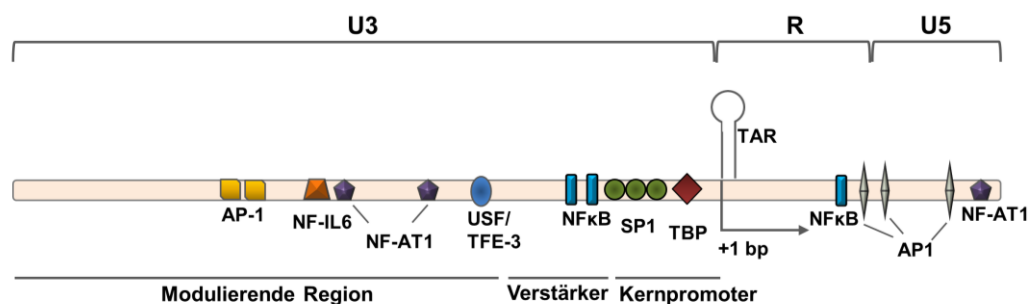


Abbildung 4: Schematischer Aufbau des HIV 5' LTRs. Funktionell wird der LTR in einen Kernpromotor, einen Verstärker und eine modulierende Region unterteilt. Farbliche Symbole stellen verschiedenem Bindestellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren dar. +1 = Transkriptionsstartpunkt, TAR = transactivation-responsive region.

Der genaue Aufbau des 5' LTRs ist in Abbildung 4 zu sehen. Funktionell besteht er aus dem Kernpromotor, einem Verstärker und einer modulierenden Region.

Nachdem der HIV Provirus in das Genom der Wirtszelle integriert wurde (1.1.3), nutzt der 5' LTR die zelluläre Transkriptionsmaschinerie für die Expression von HIV Genen. Der HIV 5' LTR enthält eine Vielzahl an Bindestellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren, von denen nur ein Teil in Abbildung 4 dargestellt ist [17]. Innerhalb des Kernpromotors befinden sich u.a. Bindestellen für die zellulären Transkriptionsfaktoren TBP (*engl.* TATA box binding protein) und SP1, welche beide essentiell für die HIV Transkription sind [18]. Weiter upstream im Verstärker Bereich befinden sich zwei Bindestellen für NF- κ B, welches nach Stimulierung von infizierten Zellen durch verschiedenen Chemokine exprimiert wird. NF- κ B ist in der Lage die Proteinexpression ausgehend vom 5' LTR um das 50-fache zu verstärken [19]. Innerhalb der modulierenden Region befinden sich eine Vielzahl an Transkriptionsfaktorbindestellen, die abhängig vom infiziertem Zelltyp unterschiedlich starke Effekte auf die HIV Transkription haben [17].

Downstream vom Kernpromotor befindet sich der Transkriptionsstartpunkt, der den Beginn

des TAR Elements gleichkommt. Bei der Transkription des HIV Provirus wird als erstes TAR (*engl.* transactivation-responsive region) RNA gebildet. Das HIV Protein Tat bindet an TAR, wodurch Tat in der Lage ist zelluläre Transkriptionsfaktoren zum LTR zu rekrutieren, welche dann an die jeweiligen Bindestellen binden [16].

Der Aufbau des 5' LTRs zeigt bereits, dass die HIV Transkription stark reguliert ist und von einer Vielzahl an verschiedenen Faktoren abhängt [16,17].

1.1.2.2 Virusaufbau

Infektiöse, reife HIV Partikel weisen in Schnitt einen Durchmesser von 100-120 nm auf. Der genaue Aufbau eines Viruspartikels ist an Abbildung 5 dargestellt. Umgeben ist das Virus von einer Doppellipidmembran, die sich von der Membran der Zelle ableitet von der das Virus geknospt ist. Eingelagert in die virale Hüllmembran finden sich virale Glykoproteine, welche aus einem Transmembranprotein (gp41) und einem daran nicht kovalent gebundenen externen Protein (gp120) bestehen [20,21]. Beide Proteine leiten sich von einem gemeinsamen Vorläuferprotein (gp160) ab, welches durch eine zelluläre Protease in einen C-terminalen Teil (=gp41) und einem N-terminalen Teil (=gp120) gespalten wird. Die heterodimeren Proteinkomplexe aus gp41 und gp120 liegen als Trimere in der Hüllmembran vor und sind stark glykosyliert [22,23]. Über N-terminale Myristinsäurereste ist auch das Matrixprotein (p17) an der Hüllmembran verankert. In Form von Trimeren kleidet es die komplette Innenseite der viralen Hüllmembran aus und sorgt somit für die physische Stabilität des Viruspartikels [13]. Über das Linkerprotein (p6) ist das Viruskapsid mit der Hüllmembran verbunden. Das p6 Protein sorgt außerdem dafür das Vpr in das Virion inkorporiert wird [24]. Das Viruskapsid besteht aus dem Kapsidprotein p24, welches eine konische Hülle für das virale Genom bildet [25]. Das virale Genom besteht aus zwei identischen nicht kovalent oder durch Basenpaarung verbundenen Einzelstrang-RNA Molekülen, welche mit dem Nukleokapsidprotein p7 und der Reversen Transkriptase komplexiert sind. Das p7 Protein ist für das Verpacken der RNA Genome in neue Viren verantwortlich, da es mit seiner Zink-Finger Domäne in der Lage ist die RNA Genome zu binden. Auch die virale Integrase (IN) und Protease (PR) befinden sich im HIV Kapsid [24].

Ebenfalls im HI-Virion sind die akzessorischen Proteine Vpr, Vif und Nef zu finden. Vpr sorgt für einen Arrest von infizierten Zellen in der G2 Zellzyklusphase und ist in den Transport des Präintegrationskomplexes (1.1.3) zum Zellkern eingebunden. Vif wird benötigt um während der Infektion von primären T-Zellen und Makrophagen die zellulären Restriktionsfaktoren der APOBEC3 Familie zu inhibieren. Nef ist maßgeblich an der Pathogenität von HIV beteiligt, da es an der Herunterregulierung von CD4 und MHC-Klasse I beteiligt ist. Zudem werden Nef Rollen an der Zellaktivierung und Infektiösität von HIV zugeschrieben [24,26–28].

Neben reifen HIV Partikeln existieren auch unreife Partikel, die nicht infektiös sind. Nachdem ein Virion von einer Wirtszelle geknospt ist, liegt es als unreifer Viruspartikel vor. In diesem Status sind die Gag-Pol Polyproteine nicht prozessiert und es fehlt somit an viralen Strukturproteinen. Die Protease spaltet sich nun autokatalytisch aus dem Polyprotein heraus und prozessiert alle viralen Strukturproteine, wodurch unter anderem das Kapsid entsteht. Erst jetzt ist der Viruspartikel infektiös (1.1.3, [29]).

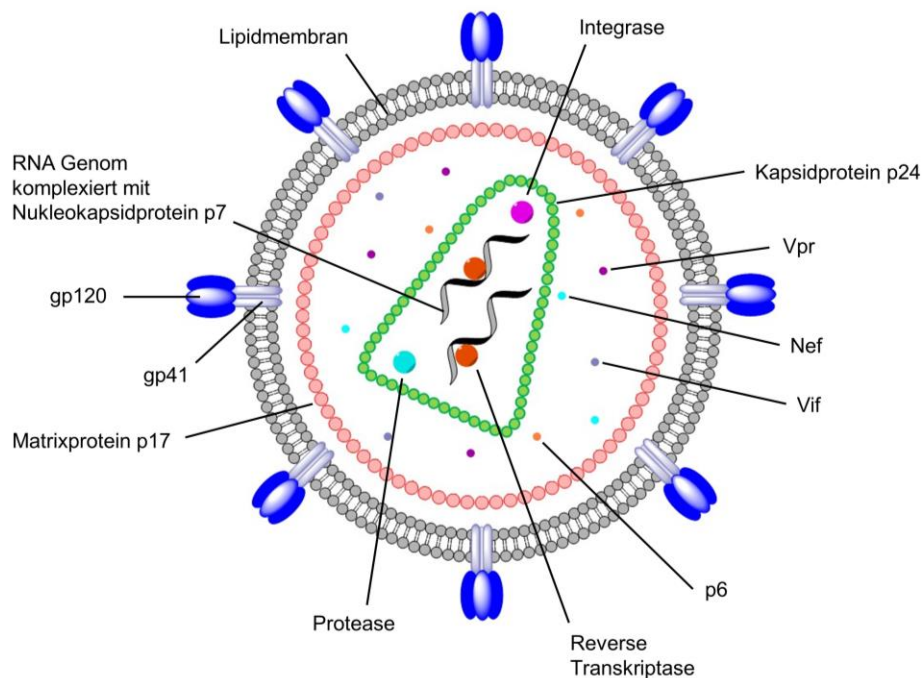


Abbildung 5: Aufbau eines reifen HIV-Partikels. HIV Partikel sind von einer Lipidmembran umhüllt, in der die viralen Glykoproteine gp120 (extrazellulär) und gp41 (Transmembranprotein) als Trimere (blau) eingebettet sind. Über Myrestinsäurereste ist das Matrixprotein p17 (rot) an die Hüllmembran gebunden. Das virale Kapsid (grün) besteht aus dem Kapsidprotein p24 und enthält zwei Kopien des HIV RNA Genoms, welches sowohl mit der Reversen Transkriptase (orange) als auch dem Nukleokapsidprotein p7 komplexiert ist. Auch die Integrase (pink) und die Protease (hellblau) sind im Kapsid zu finden. Weitere Proteine, die im Virion zu finden sind, sind Vif, Vpr, Nef und p6.

1.1.3 Aktiver HIV-Replikationszyklus

Die primären Wirtszellen für HIV sind T-Lymphozyten, Makrophagen und Monozyten. Diese Zelltypen exprimieren auf ihrer Oberfläche den Rezeptor CD4, der als Hauptrezeptor für eine HIV Infektion benötigt wird, und die Ko-Rezeptoren CCR5 oder CXCR4 [13]. Der Replikationszyklus von HIV ist in Abbildung 6 dargestellt.

Ein infektiöser Viruspartikel (Abbildung 5) nähert sich einer Zelle zuerst über unspezifische Interaktionen der negativ geladenen gp41/gp120 Trimere mit der Zellmembran und über

Interaktionen von gp120 mit verschiedenen zellulären Oberflächenproteinen, wie zum Beispiel Integrinen, Heperansulfat oder dem Manose-bindenden Lektin [30]. Im Anschluss kommt es zu einer Bindung von gp120 an den Rezeptor CD4 und an einen der Ko-Rezeptoren CCR5 oder CXCR4. Durch die Interaktion von gp120 mit CD4 kommt es zu einer Konformationsänderung in gp41, wodurch die Fusion der viralen mit der zellulären Membran eingeleitet wird [23,31]. Durch die Fusion wird das virale Kapsid in das Zytoplasma der Wirtszelle transportiert. Das Kapsid zerfällt und setzt somit das RNA Genom, die Reverse Transkriptase und die Integrase frei [13]. Die Reverse Transkriptase schreibt das einzelsträngige RNA Genom zuerst in ein doppelsträngiges RNA-DNA Hybridmolekül um und synthetisiert letztendlich ein doppelsträngiges DNA Molekül [32,33]. Das dsDNA Genom wird mit verschiedenen viralen und zellulären Proteinen komplexiert und bildet den PIC (*engl.* pre-integration complex). Einzelne Proteine des PIC interagieren mit Importproteinen des Zellkerns und sorgen dafür, dass der PIC in den Zellkern aufgenommen wird. Durch die virale Integrase, welche ein Teil von PIC ist, wird das dsDNA Genom in das Wirtsgenom integriert (=Provirus [34]). Nach der Integration erfolgt die Transkription des Provirus ausgehend vom 5' LTR, der als Promotor fungiert (Abbildung 4). Das HIV Genom wird hierbei immer als Ganzes abgelesen. Zu Beginn bricht die Transkription nach der Synthese der ersten 60 nt immer wieder ab, nur vereinzelt wird ein komplettes HIV Transkript gebildet. Dieses Transkript wird vollständig gespleißt und im Zytoplasma in die Proteine Tat, Rev und Nef translatiert. Tat und Rev werden wieder in den Zellkern transportiert [16]. Tat (*engl.* transactivator of transcription) bindet an frei werdende TAR RNA-Sequenzen, wodurch es in der Lage ist die zelluläre Kinase CDK9 zu rekrutieren. CDK9 liegt als Komplex mit Cyclin-T1 vor und beide sind Teil des P-TEFb (*engl.* positive transcription elongation factor b) Komplexes. Durch die Rekrutierung von P-TEFb in die unmittelbare Nähe des 5' LTRs, wird eine Vielzahl an zellulären Transkriptionsfaktoren ebenfalls an den 5' LTR rekrutiert und es kommt zu einer stabilen und effektiven HIV Transkription [35,36]. Rev (*engl.* regulator of expression of virion proteins) bindet an das RRE (*engl.* Rev responsive element), welches an frei werdenden HIV Transkripten zu finden ist und sorgt so für die Stabilität von ungespleißten und unvollständig gespleißten HIV mRNAs. Gleichzeitig vermittelt Rev den Export dieser mRNAs ins Zytoplasma durch die Rekrutierung des zellulären mRNA Exportfaktors CRM1 [16,37]. Im Zytoplasma kommt es zur Translation von HIV Proteinen. Gag- und Gag-Pol-Vorläuferproteine werden translatiert und direkt in neue Viruspartikel verpackt. Das Env Vorläuferprotein wird im Golgi-Apparat zu den Untereinheiten gp120 und gp41 prozessiert, welche gleichzeitig stark glykosyliert werden. Gp120 und gp41 bilden Trimere und werden an die Zellmembran transportiert. An der Zellmembran lagern sich alle Bestandteile eines neuen Viruspartikels zusammen und knospen schließlich von der Zellmembran ab. Innerhalb des freigewordenen Viruspartikels prozessiert die virale

Protease, welche sich zuvor autokatalytisch selbst aus dem Gag-Pol Vorläuferprotein herausschneidet, die Gag- und Gag-Pol-Vorläuferproteine zu Einzelproteinen. Erst jetzt ist der neue Viruspartikel infektiös [24,29].

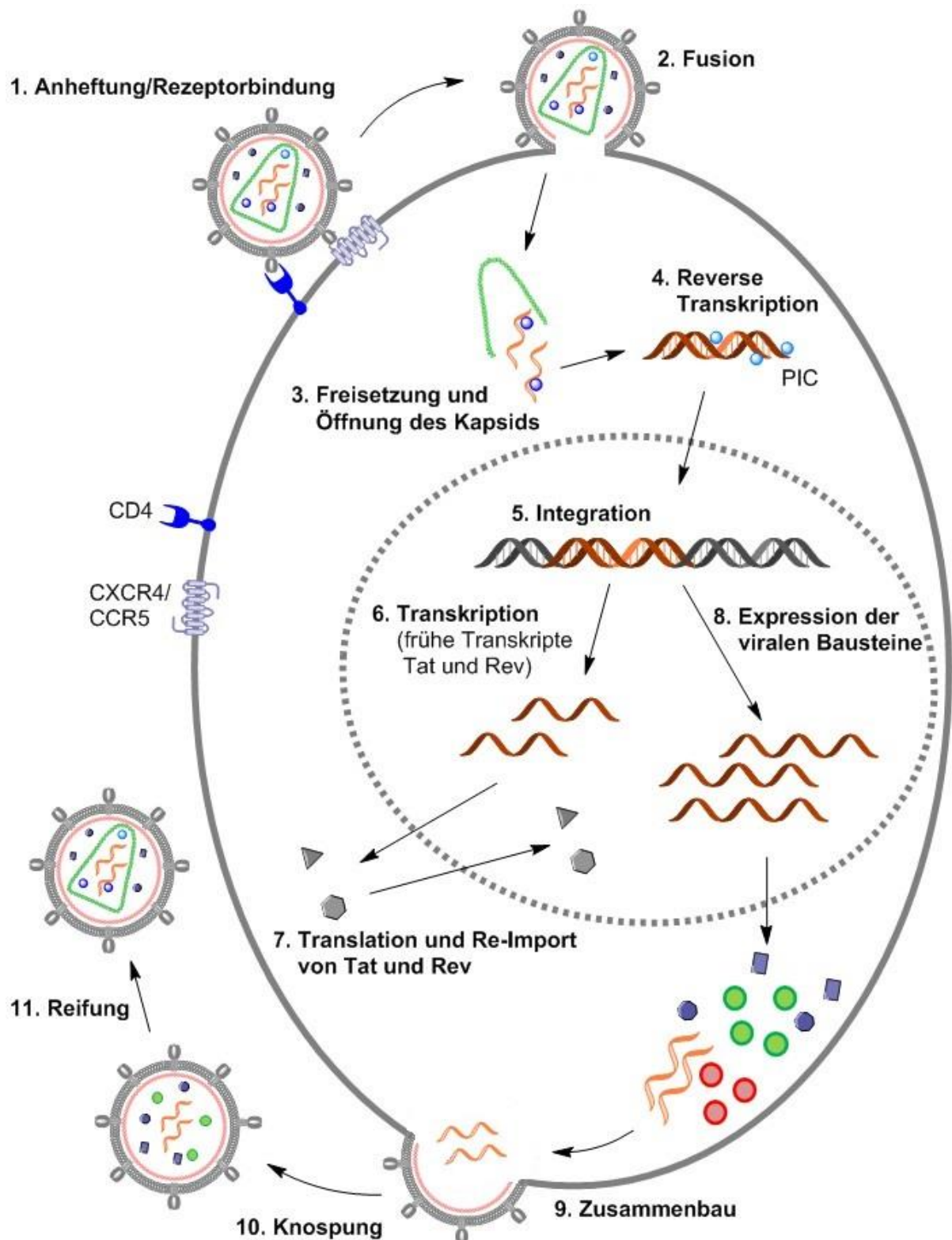


Abbildung 6: Replikationszyklus von HIV. Der HIV Partikel bindet an eine Wirtszelle

durch die Interaktion von gp120 mit CD4 und einem der Ko-Rezeptoren CXCR4 oder CCR5 (1. Anheftung). Durch die Bindung von gp120 an CD4 kommt es zur Konformationsänderung in gp41, welche die Fusion der viralen mit der zellulären Membran einleitet (2. Fusion). Durch die Fusion gelangt das Kapsid in das Zytoplasma der Wirtszelle, wo es zerfällt und somit das virale Genom freisetzt (3. Freisetzung und Öffnung des Kapsids). Mit Hilfe der reversen Transkriptase wird das ssRNA Genom in ein doppelsträngiges DNA Genom umgeschrieben (4. Reverse Transkription). Gleichzeitig wird das dsDNA Genom von verschiedenen Proteinen komplexiert (=PIC). Die virale Integrase vermittelt die Integration des Provirus in das Wirtsgenom (5. Integration). Zu den ersten viralen Proteinen, die exprimiert werden, gehören Tat und Rev (6. Transkription). Nach dem Re-Import in den Zellkern (7. Translation und Re-Import von Tat und Rev), sorgt Tat für eine stabile Transkription des Provirus und Rev stabilisiert virale Transkripte und vermittelt deren Export. Alle viralen Bausteine werden im Zytoplasma translatiert und lagern sich an der Zellmembran an (8. Expression der viralen Bausteine und 9. Zusammenbau), bevor ein neuer Viruspartikel von der Wirtszelle knospt (10. Knospung). Die virale Protease schneidet sich autokatalytisch aus dem Gag-Pol Vorläuferprotein heraus, prozessiert sämtliche Vorläuferproteine und ermöglicht somit die Reifung des Virion zu einem infektiösem HI-Partikel (11. Reifung).

1.1.4 Behandlung von HIV-Infektionen durch cART (*engl.* combined anti-retroviral therapy)

Zurzeit sind laut FDA 25 ART (= antiretrovirale Therapie) Wirkstoffe zur Behandlung von HIV Infektionen zugelassen (<https://www.fda.gov/ForPatients/Illness/HIVAIDS/Treatment/ucm118915.htm>; 10.04.2017). Diese werden aufgrund ihres Wirkungsmechanismus in verschiedene Kategorien eingeteilt (Tabelle 1). Die Behandlung erfolgt durch die Kombination von bis zu drei verschiedenen Wirkstoffen, die dabei aus mindestens zwei verschiedenen Kategorien stammen sollten [38].

Tabelle 1: Alle zugelassenen HIV Wirkstoffe sind zusammen mit ihrem Wirkmechanismus aufgelistet. RT= Reverse Transkriptase.

Kategorie	Anzahl zugelassene Wirkstoffe	Wirkmechanismus
Reverse Transkriptase Inhibitor (NRTI)	7	Inhibierung der RT durch nukleosidische Analoga
Reverse Transkriptase Inhibitor (NNRTI)	5	Inhibierung der RT durch nicht-nukleosidische Analoga
Integrase Inhibitor	3	Inhibierung der Provirus Integration
Protease Inhibitor	8	Inhibierung der Viruspartikelreifung
Fusion Inhibitor	1	Inhibierung der Fusion von viraler und zellulärer Membran
CCR5 Inhibitor	1	Inhibierung der Bindung an CCR5

Obwohl die medikamentöse Behandlung von Patienten sehr erfolgreich ist, gibt es einige Nachteile bzw. Probleme mit ART Medikamenten. So verursachen vor allem Protease Inhibitoren starke Nebenwirkungen, wie zum Beispiel Übelkeit, Durchfall oder Hepatitis [39]. Außerdem treten durch die hohe Mutationsrate von HIV immer wieder Viren auf, die eine Resistenz gegen ein oder auch mehrere Medikamente gebildet haben. Somit muss die Therapie laufend angepasst werden [40]. Da ART Medikamente zudem nur virusstatisch wirken, sind Patienten auf eine lebenslange Therapie angewiesen, da bei Unterbrechung der Behandlung die Viruslast wieder ansteigt. ART Medikamente greifen außerdem nur in die aktive Virusreplikation ein, HIV Reservoir (Details in Abschnitt 1.1.5) werden also nicht von ART Medikamenten beeinflusst [41]. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl von ART Medikamenten nicht in der Lage ist die Blut-Hirn Schranke effektiv zu überwinden [42].

1.1.5 HIV Latenz und HIV Reservoir

Neben einem aktiven Replikationszyklus, wie in Abschnitt 1.1.3 beschrieben, ist HIV in der Lage eine latente Infektion in einer Wirtszelle zu etablieren. Unter einer latenten Infektion versteht man, dass das Genom eines Virus in der Zelle vorhanden ist, die Vermehrung des Virus aber vorübergehend blockiert ist. Als Konsequenz aus einer latenten Infektion werden keine neuen Viruspartikel gebildet. Die Latenz kann aber überwunden werden, z.B. durch die Aktivierung einer Zelle durch externe Stimuli, wodurch der Virus sich wieder aktiv repliziert und es auch zur Bildung neuer Viruspartikel kommt [43].

Bei HIV Infektionen können zwei Arten von Latenz beobachtet werden: Prä-Integrations Latenz und Post-Integrations Latenz. Bei der Prä-Integrations Latenz kommt es aufgrund einer Inhibierung während der reversen Transkription oder aufgrund eines fehlgeschlagenen Transports des PICs in den Zellkern dazu, dass der HIV Provirus nicht in das Wirtsgenom integriert wird und somit latent in der Zelle vorliegt. Bei dieser Form der Latenz wird der Provirus entweder von der Zelle abgebaut oder die Latenz Mechanismen, die die Virusproduktion blockieren, werden überwunden und es findet ein Übertritt zu einer aktiven Virusreplikation statt. Es konnte gezeigt werden, dass in ruhenden CD4-positiven T-Lymphozyten die Häufigkeit von Prä-Integrations Latenz um einiges höher ist als die von Post-Integrations Latenz, da es sich aber um eine kurzzeitige Latenzform handelt, trägt die Prä-Integrations Latenz kaum zur Persistenz von HIV im Patienten bei [44–46].

Bei der Post-Integrations Latenz ist das HIV Provirus bereits in das Wirtsgenom integriert, wird aber nicht exprimiert. Faktoren, die die Etablierung dieser Latenz begünstigen, sind z.B. das Zellzyklusstadium der Wirtszelle oder der Ort, an dem das Provirus im Wirtsgenom integriert [46]. Ruhende CD4-positive T-Gedächtniszellen sind der am besten untersuchte Zelltyp, in dem Post-Integrations Latenz zu finden ist. Dieser Zelltyp befindet sich in der G0

Phase des Zellzyklus, in der die Zelle eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren, die für die Expression des Provirus benötigt werden, nicht exprimiert und somit die Latenzbildung fördert [47]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Integration des Provirus in Heterochromatin (= transkriptionell inaktive Bereiche) des Wirtsgenoms die Etablierung einer Latenz begünstigt, außerdem führt der Übergang von Euchromatin in Heterochromatin an Stellen mit integrierten Proviren auch zur Latenz des Provirus [48]. Da die Dauer einer Post-Integrations Latenz nur durch die Lebensspanne der infizierten Zelle beeinflusst wird und keine zytotoxischen Virusprodukte gebildet werden, ist diese Latenzform der Hauptfaktor, der zur Persistenz von HIV in Patienten führt [46].

Es gibt verschiedene Zelltypen im Körper, in denen eine latente Infektion auftreten kann. Dazu gehören u.a. ruhende CD4-positive T-Gedächtniszellen, Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen und Astrozyten [43,46,49]. Eine Zellpopulation, die sich durch eine lange Lebensspanne und das Vorhandensein von latenten Proviren auszeichnet, wird als Reservoir bezeichnet. Reservoir bilden den Hauptgrund dafür, dass HIV bis heute nicht geheilt werden kann. Da in diesen Zelltypen keine aktive Virusreplikation stattfindet, werden diese Zellen weder vom körpereigenem Immunsystem erkannt (fehlen von viralen Antigenen) noch können sie durch die Behandlung mit cART (1.1.4) erreicht werden. Reservoir sorgen somit für eine lebenslange chronische HIV Infektion im Menschen [41,50].

1.1.5.1 HIV im zentralen Nervensystem (ZNS)

Obwohl HIV hauptsächlich T Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen infiziert, wurde schon bald nach der Entdeckung von HIV festgestellt, dass es auch Zellen des ZNS infizieren kann. Patienten entwickeln hierbei im Laufe der Infektion eine Form von HAND (*engl.* HIV-associated neurocognitive disorder). Die Symptome der Patienten reichen von Depressionen, Konzentrationsschwäche, Störungen im Bewegungsablauf bis hin zu starken Gedächtnisproblemen. HAND kann aufgrund der Schwere der Symptome in drei Kategorien unterteilt werden: ANI (*engl.* asymptomatic neurocognitive impairment; keine Auswirkungen auf alltägliches Leben), MND (*engl.* mild neurocognitive impairment; leichte Einschränkungen im Alltag) und HAD (*engl.* HIV-associated dementia; starke Einschränkungen im Alltag). Die Einführung von antiretroviralen Medikamenten (1.1.4) sorgte für einen starken Rückgang der HAD Patienten, allerdings blieb die Gesamtwahrscheinlichkeit eine Form von HAND zu entwickeln gleich. Heute zeigen ca. 30% aller HIV-positiven Patienten ANI Symptome, 20-30% weisen Formen von MND auf und 2-8% der Patienten entwickeln HAD [51].

Die Infektion des ZNS durch HIV erfolgt früh nach der Primärinfektion des Patienten. So konnte gezeigt werden, dass bereits 15 Tage nach einer HIV Infektion das Virus im Gehirn

des Patienten nachgewiesen werden konnte [52]. Durch die Infektion von Monozyten im Blut, welche in der Lage sind die Blut-Hirn Schranke zu überwinden, gelangt HIV in das ZNS [53]. Dort ist es in der Lage sowohl Mikroglia (= Makrophagen im ZNS) als auch neurale Progenitorzellen und Astrozyten zu infizieren. Obwohl Neuronen nicht durch HIV infiziert werden, sind die oben beschriebenen klinischen Symptome in Patienten direkt auf eine reduzierte Neuronenanzahl oder einen Funktionsverlust von Neuronen zurückzuführen [54]. Diese Effekte auf Neuronen lassen sich durch die HIV-Infektionen von Mikrogliazellen, Astrozyten und neuronalen Progenitorzellen erklären. Die Infektion dieser Zellen hat eine Vielzahl an neurotoxischen Effekten zur Folge. Mikrogliazellen sind der einzige Zelltyp im ZNS, der eine aktive HIV-Replikation zeigt und somit für die Vermehrung des Virus im ZNS verantwortlich ist. Durch die Infektion setzen Mikrogliazellen verschiedene Chemokine und Zytokine frei, die entweder direkt neurotoxisch wirken oder indirekt, zum Beispiel über die Beeinflussung von Astrozyten, zu Schäden an Neuronen führen. Im Gegensatz zu Mikrogliazellen weisen Astrozyten keine aktive HIV Replikation auf und stellen somit ein wichtiges Virusreservoir im Patienten dar. Es konnte auch gezeigt werden, dass HIV in der Lage ist neurale Progenitorzellen zu infizieren. Da sowohl Astrozyten als auch neurale Progenitorzellen im ZNS wichtige Funktionen erfüllen und vor allem die Infektion von Astrozyten weitreichende Folgen hat, wird im Folgenden die HIV Infektion dieser beiden Zelltypen genauer erläutert [49,55,56].

Neurale Progenitorzellen (NPs)

Neurale Progenitorzellen sind ein fundamentaler Bestandteil des ZNS. Sie sind in der Lage sich in Neuronen und Gliazellen zu differenzieren [57]. Identifiziert werden, können sie durch die Expression von verschiedenen Markerproteinen, wie zum Beispiel Nestin (Intermediärfilamentprotein), Sox2 (Transkriptionsfaktor) oder Vimentin (Intermediärfilamentprotein) [58].

In vitro Experimente haben bereits bestätigt, dass sich NPs durch HIV infizieren lassen [59]. Auch in Gehirnschnitten von verstorbenen Patienten konnten HIV-Proteine oder provirale DNA in Nestin-positiven Zellen gefunden werden [60]. Die genauen Auswirkungen von HIV-infizierten NPs auf die Neuropathogenese sind wenig erforscht. Es wird allerdings vermutet, dass die verzögerte Gehirnentwicklung, die vor allem bei HIV-infizierten Kindern auftritt, im Zusammenhang mit der Infektion von NPs steht [61].

Astrozyten

Astrozyten erfüllen eine Vielzahl an unterschiedlichen Aufgaben im ZNS. Die Aufrechterhaltung der Blut-Hirn Schranke, Kontrolle der extrazellulären Homöostase, Aufnahme und Metabolisierung von Neurotransmittern sowie Signalübertragung zwischen

Astrozyten und Neuronen und Astrozyten und Blutgefäßen gehören zu den vielseitigen Aufgaben dieses Zelltyps. Zelluläre Markerproteine für Astrozyten sind unter anderem GFAP (Intermediärfilamentprotein), S100 β (Kalzium-bindendes Protein) oder Aquaporin4 (Membranprotein) [62].

Die Autopsie von AIDS Patienten zeigte, dass in Gehirnschnitten verschiedene HIV Marker in Astrozyten gefunden wurden. Dazu gehörten provirale DNA, virale mRNAs und die Proteine Nef und Tat. All diese Marker repräsentieren frühe Phasen des Replikationszykluses, späte Marker, wie zum Beispiel Gag-Proteine, wurden dagegen selten gefunden. Dies lässt darauf schließen, dass keine aktive HIV Replikation in Astrozyten stattfindet [63]. In Zellkultur Experimenten konnte gezeigt werden, dass nach der Primärinfektion eine aktive Virusreplikation stattfand, welche nach einigen Tagen abnahm bis sie nicht mehr nachweisbar war. Trotzdem waren diese infizierten Astrozyten in der Lage ko-kultivierte Monozyten oder T-Zellen zu infizieren, was beweist, dass sie einen voll funktionsfähigen Provirus enthalten. Astrozyten stellen damit ein wichtiges HIV Reservoir im Körper dar [64,65].

Die Auswirkungen, die HIV-infizierte Astrozyten auf Neuronen haben, sind sehr komplex. Ein direkter Effekt auf Neuronen wird zum Beispiel durch das HIV Protein Tat vermittelt, das in infizierten Astrozyten exprimiert und in die extrazelluläre Matrix abgegeben wird [66]. Tat hat eine direkte neurotoxische Wirkung, so war die intrazerebrale Injektion eines Tat Peptids in Mäusen stets letal [67]. Die Aufnahme von Tat in Neuronen führt unter anderem zu einem Anstieg an intrazellulärem Kalzium und zur Bildung von Sauerstoffradikalen (=ROS) in Mitochondrien, was wiederum zur Expression von Apoptose Proteinen führt, die den neuronalen Zelltod einleiten [68].

Tat hat auch direkte Auswirkungen auf den Metabolismus von Astrozyten. So führt die Anwesenheit von Tat zur Expression von inflammatorischen Zytokinen, wie CCL2. CCL2 wiederum rekrutiert Monozyten ins ZNS, die ihrerseits Zytokine, Chemokine und Neurotoxine freisetzen [69]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass von Monozyten freigesetztes TNF- α zu einer verminderten Aufnahme von Glutamat durch Astrozyten führt. Astrozyten regulieren den extrazellulären Glutamat Haushalt im ZNS, eine zu hohe Konzentration von extrazellulärem Glutamat führt zu einem exzitatorischen Zelltod von Neuronen [66].

Die durch infizierte Astrozyten freigesetzten Zytokine binden auch an Rezeptoren von BMECs (*engl.* brain microvascular endothelial cells), was wiederum zu einer Destabilisierung der Blut-Hirn Schranke führt [70].

Die HIV Infektion von Astrozyten hat eine Vielzahl von Effekten, die im Zusammenhang mit der Neuropathogenese von HIV stehen. Deswegen ist es wichtig dieses Reservoir weiter zu

erforschen und Strategien zu entwickeln, um die Auswirkungen von HIV Infektionen in Astrozyten einzuschränken.

1.1.5.2 Strategien zur Behandlung von HIV Reservoiren

Der Hauptgrund warum HIV Infektionen bis heute nicht geheilt werden können, sind HIV Reservoiren in verschiedenen Organen der Patienten. Durch eine cART Behandlung wird die Viruslast in Patienten unter das Detektionslimit reduziert, sobald die Behandlung unterbrochen wird, steigt die Viruslast allerdings wieder an [47]. Dies liegt an HIV Reservoiren, in denen das integrierte virale Genom in seiner latenten Form vorliegt. Durch externe Stimuli kann das HIV Genom wieder reaktiviert werden und es kommt erneut zu einer aktiven Virusreplikation (1.1.5).

„shock and kill“ Strategie

Eine Strategie, um gegen diese latenten HIV Reservoiren vorzugehen, ist der „shock and kill“ Ansatz. Hierbei soll in Patienten die Virusproduktion in Reservoirzellen aktiv durch medikamentöse Behandlung reaktiviert werden und gleichzeitig soll die cART Behandlung intensiviert werden. Durch die Re-Aktivierung der Virusproduktion in latenten Reservoirzellen sollen diese entweder durch zytopathische Effekte aufgrund der HIV Replikation sterben oder sie könnten vom körpereigenen Immunsystem angegriffen werden. Gleichzeitig würde eine Intensivierung der cART Behandlung verhindern, dass *de novo* Infektionen von Zellen durch HI-Viren aus den reaktivierten Reservoiren stattfinden. Erste Erfolge in *ex vivo* Studien [71], die die Re-Aktivierbarkeit von latent infizierten CD4-positiven T-Zellen zeigten, wurden aber bald durch darauffolgende Studien ergänzt, in denen gezeigt wurde, dass die gleichzeitige Behandlung von Patienten mit einem LRA (*engl.* latency reversing agent) und cART zu keiner Reduktion an latenten Reservoirzellen im Patienten führt [72–74].

Grundsätzlich gibt es einige Bedenken, die mit dem „shock and kill“ Ansatz einhergehen [75]:

- (a) Der Einsatz von LRAs reaktiviert nicht nur die Virusproduktion in latent infizierten T Lymphozyten, sondern aktiviert auch naive T Lymphozyten an sich. Diese Aktivierung kann verschiedene Auswirkungen haben. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die Behandlung von CD4-positiven T Zellen mit dem LRA Virinostat (SAHA) zu einer erhöhten Infektionsrate dieser Zellen durch HIV führt [76].
- (b) Da bekannt ist, dass verschiedene Mechanismen die Latenz von HIV fördern, besteht die Möglichkeit, dass ein LRA, welcher nur einen Aspekt der Latenz angreift, nicht ausreicht, um alle latenten Reservoirzellen zu re-aktivieren [75].
- (c) Eine Voraussetzung für den Erfolg einer „shock and kill“ Therapie ist, dass sowohl die Behandlung durch einen LRA als auch die cART Behandlung alle im Körper vorhandenen

Reservoir erreicht. Zumindest für Reservoir im ZNS wurde allerdings bereits gezeigt, dass nicht alle zugelassenen ART Wirkstoffe therapeutisch ausreichende Konzentrationen im ZNS erreichen [42].

(d) Durch den Einsatz von LRAs können auch andere latente Viren im Patienten re-aktiviert werden, zum Beispiel das Epstein-Barr Virus, das Cytomegalovirus oder das Herpes Simplex Virus [77–79].

Vor allem bei Reservoir im ZNS birgt der „shock and kill“ Ansatz weitere Gefahren. Durch die absichtliche Re-Aktivierung von latenten HIV Proviren würde der zytopathische Effekt der Virusreplikation zu einem Verlust von Mikrogliazellen und Astrozyten führen. Dieser Effekt würde auch bei T-Zellreservoir auftreten. Im Gegensatz zu Astrozyten, zeichnen sich T-Zellen allerdings durch eine schnelle Zellerneuerung aus und könnten den Verlust an T-Zellen im Patienten somit ausgleichen, was bei Astrozyten nicht der Fall wäre. Außerdem würde die erhöhte Virusreplikation im ZNS die neurotoxischen Effekte einer HIV Infektion verschlimmern (siehe oben), was fatale Folgen für den Patienten hätte [75,80].

„soothe and snooze“ Strategie

Ein anderer Ansatz zur Behandlung von Reservoir ist die sogenannte „soothe and snooze“ Strategie. Hierbei wird versucht eine permanente Stilllegung des latenten HIV Provirus zu erreichen und somit zu verhindern, dass durch die Reaktivierung von Reservoirzellen eine erneute HIV Produktion in diesen Zellen stattfinden kann [75]. Ein Beispiel hierfür ist die Behandlung von Zellen mit dem HIV-1 Tat-Inhibitor Didehydro-Cortistatin A. Hierbei konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit dem Inhibitor die Reaktivierung in latent infizierten T-Lymphozyten verhindert werden konnte [81]. Allerdings wäre auch hierbei eine lebenslange Einnahme von Medikamenten nötig.

Eine weitere Möglichkeit die „soothe and snooze“ Strategie zu verfolgen, wären gentherapeutische Ansätze. Hierbei wäre es möglich zelluläre HIV Restriktionsfaktoren in Reservoirzellen zu exprimieren. Es wurden bereits einige zelluläre Proteine entdeckt, die in der Lage sind die HIV Replikation auf verschiedenen Ebenen zu inhibieren [82]. Ein Beispiel hierfür ist die Proteinfamilie Risp/Fam21. Nach einem Yeast-Two Hybrid Screen mit einer HIV-Rev Sequenz wurde eine mit Rev interagierende Proteinsequenz mit dem Namen 16.4.1 identifiziert. 16.4.1 ist in den Risp/Fam21 Proteinen enthalten. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von 16.4.1 in einer persistent infizierten Astrozytom-Zelllinie (TH4-7-5; 2.1.7) zu einer Reduktion der HIV Replikation führte, während siRNAs gegen 16.4.1 zu einem Anstieg der HIV Replikation führten. In beiden Fällen konnte der Effekt auf die HIV Replikation auf eine Abnahme oder einen Anstieg der Rev Funktion zurückgeführt werden [83,84]. Eine dauerhafte Überexpression der 16.4.1-Sequenz könnte

also durch die Inhibierung der Rev Funktion zu einer permanenten Stilllegung des HIV Provirus in latent infizierten Astrozyten führen.

Ein vollkommen anderer Ansatz, der vor allem in den letzten Jahren vermehrt untersucht wurde, ist die gezielte Mutation des HIV Provirus durch Genomeditierungssysteme. Die Idee hierbei ist, dass man mit Hilfe von Genomeditierungssystemen (Tabelle 2) gezielt, den HIV Provirus auch in latenten Reservoirzellen angreifen könnte ohne dabei in andere zelluläre Abläufe einzugreifen, was bei einer medikamentösen Behandlung der Fall wäre (Details siehe Abschnitt 1.3). Die Genomeditierungssysteme würden hierbei dafür verwendet werden Mutationen einzuführen, die den HIV Provirus dauerhaft inhibieren. Es gibt bereits einige Studien, in denen dieser Ansatz erfolgreich umgesetzt wurde [85–88].

Da jeder gentherapeutische Ansatz den Einsatz eines viralen Vektors voraussetzt, werden im folgenden Kapitel Adeno-assoziierte Viren vorgestellt, die ein potentes virales Vektorsystem darstellen.

1.2 Adeno-assoziierte Viren (AAVs)

Adeno-assoziierte Viren gehören zur Familie der Parvoviren und darin zum Genus Dependovirus. AAVs sind kleine, im Durchmesser ca. 20 nm große, unbehüllte Viren, die ein einzelsträngiges DNA Genom beherbergen. Erstmals entdeckt wurden sie Anfang der 1960er Jahre als Ko-Infektionen in Adenovirus-infizierten Zellkulturen [13]. Ca. 80% der Bevölkerung sind positiv für Antikörper gegen AAVs, was eine vorherige Infektion voraussetzt. Es wurden aber bis heute keinerlei Krankheitsbilder mit einer AAV Infektion in Zusammenhang gebracht [89].

1.2.1 Genom- und Virusaufbau

Der am besten erforschte AAV Serotyp ist AAV2. Anhand von AAV2 wird im Folgenden der Aufbau des viralen Genoms und des Viruspartikels erläutert.

Das Genom von AAV2 ist 4860 nt lang und besteht aus einem einzelsträngigen, linearen DNA Molekül (Abbildung 7A). Es enthält 2 Leserahmen, die für insgesamt 7 Proteine kodieren. Flankiert werden die Leserahmen von 2 palindromischen Sequenzen, den ITRs (*engl.* Inverted terminal repeats), welche im Fall von AAV2 jeweils 145 nt lang sind. ITRs sind während des Replikationszykluses an der Amplifikation des viralen Genoms, der Integration des viralen Genoms in das Wirtsgenom und der Verpackung von neuen viralen Genomen in das Kapsid beteiligt. Da die ITRs nicht nur zueinander komplementär sind, sondern auch innerhalb einer Sequenz komplementäre Bereiche enthalten, können sie T-

förmige Haarnadelschleifen ausbilden [13,90].

Das AAV Genom enthält drei Promotoren, die aufgrund ihrer Lage im viralen Genom p5, p19 und p40 Promotor genannt werden. Vom p5 Promotor aus werden die mRNAs für die regulatorischen Proteine Rep78 und Rep52 synthetisiert, wobei Rep52 aus einer gespleißten mRNA gebildet wird. Der Promotor p19 kontrolliert die Transkription der regulatorischen Proteine Rep68 und Rep40. Rep40 wird hierbei erneut von einer gespleißten mRNA gebildet. Die mRNAs der drei Kapsidproteine VP1, VP2 und VP3 werden ausgehend vom p40 Promotor synthetisiert. Aufgrund von alternativen Spleißvarianten benutzen alle drei VP Transkripte unterschiedliche Startkodons für die spätere Translation [91].

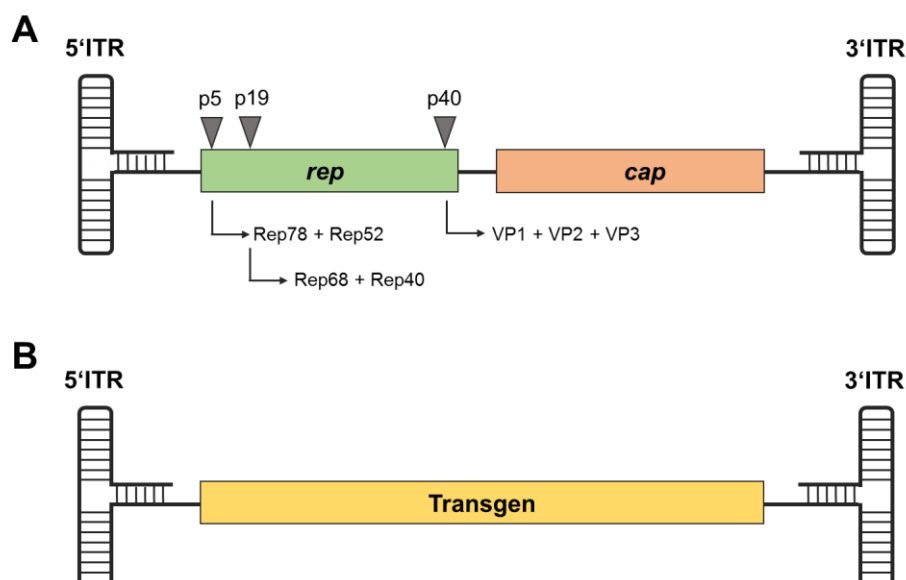


Abbildung 7: Schema des AAV Genoms. (A) Das Genom von AAVs enthält zwei Leserahmen (*rep*, *cap*), deren Transkription von drei verschiedenen Promotoren (p5, p19, p40) kontrolliert werden. Rep78, Rep68, Rep52 und Rep40 sind regulatorische Proteine und VP1, VP2 und VP3 bilden die Kapsidproteine. Flankiert wird das Genom von zwei ITR Sequenzen, die T-förmige Sekundärstrukturen ausbilden. (B) Um AAVs als virale Vektoren zu benutzen, wird das komplette Genom bis auf die ITRs durch das gewünschte Transgen ersetzt. Alle zur Replikation benötigten Gene werden *in trans* zugefügt. Details siehe Abschnitt 1.2.3.

Die Viruspartikel sind ikosaedrisch aufgebaut, nicht von einer Lipidmembran umhüllt und besitzen einen Durchmesser von ca. 20 nm. An den Ecken des Kapsides befinden sich 7 nm lange Fortsätze. Das Viruskapsid besteht aus den Proteinen VP1, VP2 und VP3 im

Verhältnis 1:1:10. Das VP2 Protein komplexiert über Aminosäuren im Inneren des Viruspartikels das Genom an das Kapsid [13,92].

1.2.2 Replikationszyklus

AAVs werden oft als „defekte“ Viren bezeichnet, da sie ohne eine Ko-Infektion der gleichen Wirtszelle durch zum Beispiel Adenoviren nicht in der Lage sind sich aktiv zu replizieren. Infiziert ein AAV eine Zelle ohne passende Ko-Infektion, so integriert das AAV Genom in das Wirtsgenom und etabliert eine Latenz. Ein Übertritt zu einer aktiven Replikation tritt nur ein, wenn die Zellen durch Adenoviren infiziert werden. Im Folgenden wird ein aktiver Replikationszyklus von AAV2 erläutert [89].

Der erste Schritt im Replikationszyklus ist die Bindung des AAV Partikels an einen zellulären Rezeptor. Für AAV2 wurden als Rezeptoren Heperansulfat und FGFR1 (*engl.* Fibroblast growth factor receptor 1) identifiziert. Andere AAV Serotypen benutzen unterschiedliche zelluläre Rezeptoren (Tabelle 22), um an eine Zelle zu binden [93,94]. AAV2 wird als nächstes durch eine Clathrin-vermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen [95]. Die Details der weiteren Schritte sind bis heute nicht geklärt. So ist zum Beispiel nicht bekannt auf welchen Weg das AAV Genom in den Zellkern kommt oder an welchem Punkt das AAV Kapsid geöffnet wird, um das AAV Genom freizusetzen. Letztendlich findet sich das AAV Genom im Zellkern der infizierten Zelle wieder, wo die DNA Amplifikation stattfindet [96]. Im ersten Schritt der DNA Amplifikation (Abbildung 8) wird das ssDNA Genom von AAV2 zu einem dsDNA Molekül umgeschrieben. Der T-förmige 3' ITR dient hierbei als Primer für zelluläre DNA Polymerasen (Abbildung 8, [a]), die einen komplementären DNA Strang synthetisieren und gleichzeitig die Sekundärstruktur des 5' ITRs auflösen (Abbildung 8 [b], [97,98]). Vermutlich an diesem Punkt kommt es zur Integration des AAV Genoms in das Wirtsgenom und es wird eine latente Infektion etabliert. Bei diesem Schritt sind die Proteine Rep78 und Rep68 beteiligt. Beide Proteine werden nicht in AAV Partikel verpackt und gelangen somit nicht durch die ursprüngliche Infektion in die Zelle. Allerdings kommt es auch ohne Ko-Infektion durch Adenoviren zu einer schwachen Expression des AAV Genoms und somit zur Expression von Rep78 und Rep68. Die aktive DNA-Amplifikation wird aber erst nach einer Ko-Infektion fortgesetzt, wahrscheinlich wird hierfür das AAV Genom wieder aus dem Wirtsgenom herausgeschnitten [96]. Nach der Synthese des doppelsträngigen DNA-Moleküls bilden sich zwei neue T-förmige ITRs (Abbildung 8, [c]), wobei das freigewordene 3' Ende erneut als Primer für die Synthese eines komplementären DNA Strangs dient und gleichzeitig der 5' ITR Strang freigesetzt wird (Abbildung 8, [d]). Rep Proteine (vermutlich Rep78 oder Rep68) binden nun an den ursprünglichen ITR und verursachen einen Einzelstrangbruch (Abbildung 8, [d]). Das nun freigewordene 3' Ende dient erneut als Primer für eine DNA Amplifikation, die die ITR Sequenz kopiert und somit ein neues AAV Genom

freisetzt (Abbildung 8, [e]). Gleichzeitig dient das dsDNA Molekül als Basis für eine neue Amplifikationsrunde (Abbildung 8, [f]). Rep52 und Rep40 sind nun maßgeblich daran beteiligt die ssDNA Genome in AAV Kapside zu verpacken [97–99].

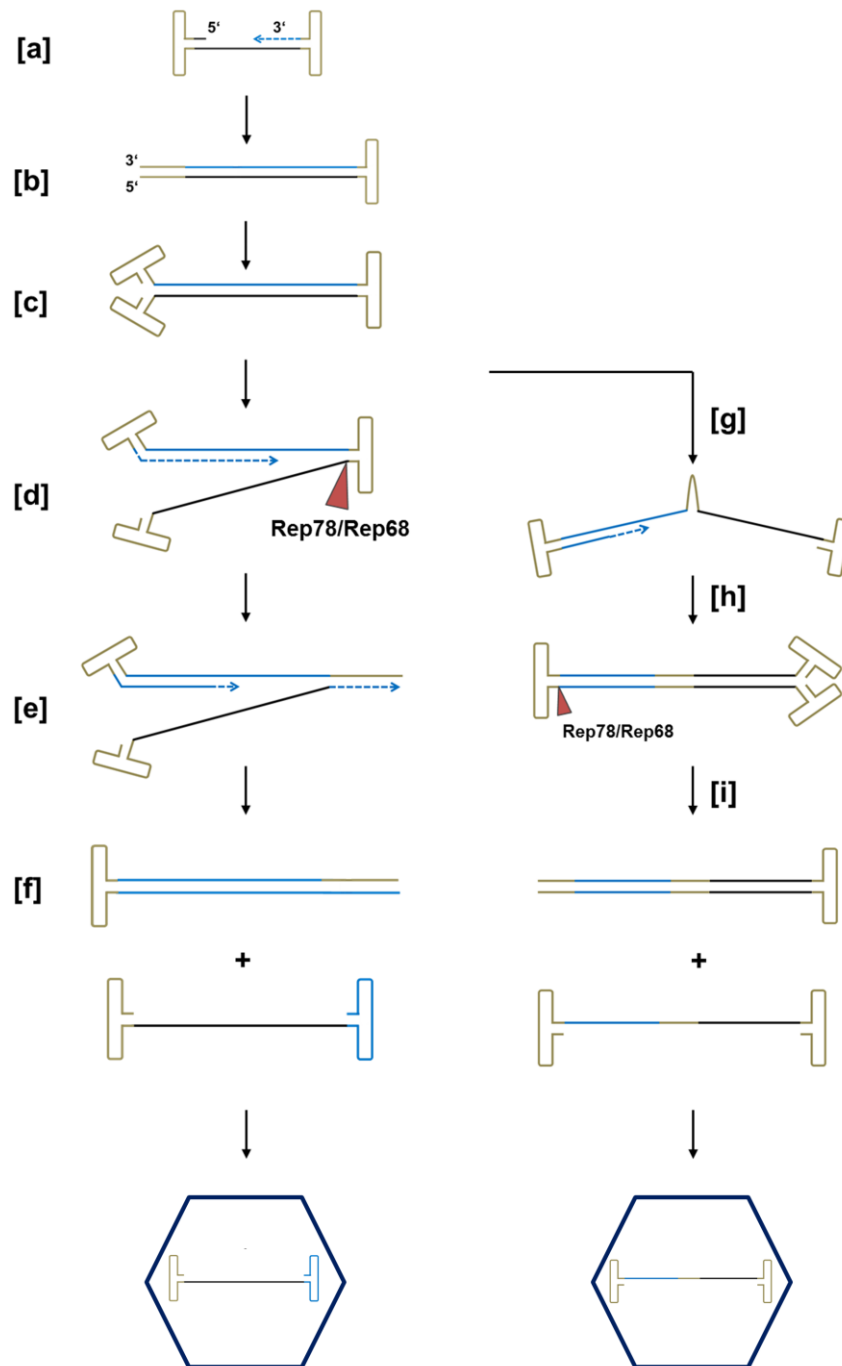


Abbildung 8: Amplifikation eines AAV Genoms. [a] Ausgehend vom 3' ITR wird ein komplementärer (blau) DNA Strang synthetisiert, gleichzeitig wird die Struktur des 5' ITRs aufgelöst [b]. Die beiden freien ITR Sequenzen bilden T-förmige Sekundärstrukturen aus [c], wobei das freie 3' Ende erneut als Primer für die Synthese eines neuen DNA Strangs dient [d]. Während der Synthese wird der untere DNA Strang (schwarz) freigesetzt und es wird ein

Einzelstrangbruch durch Rep78/Rep68 am ursprünglichen ITR verursacht [d]. Das freie 3' Ende am freiwerdenen (schwarz) DNA Strang dient als Primer für die Synthese einer komplementären DNA Sequenz, wodurch ein neues AAV Genom frei wird ([f], unten). Das entstandene dsDNA Molekül ([f], oben) dient als Vorlage für die nächste Amplifikationsrunde. Bei scAAVs (1.2.3) erfolgt kein Einzelstrangbruch durch Rep78/68 [g], dadurch wird das gesamte AAV Genom amplifiziert [h]. Nach der Bildung zweier neuer T-förmiger ITRs, wird ausgehend von einem freien 3' Ende ein neuer Strang synthetisiert, während gleichzeitig Rep78/Rep68 am verbleibenden Wildtyp 5' ITR einen Einzelstrangbruch verursachen [i]. Letztendlich entstehen ein neues scAAV Genom und ein dsDNA Molekül, welches als Vorlage für weitere Amplifikationen dient.

1.2.3 AAVs als virale Vektoren

Aufgrund ihrer Biologie eignen sich AAVs sehr gut als virale Vektoren. Werden AAVs als Vektoren verwendet, dann wird hierfür das komplette AAV Genom durch eine gewünschte Expressionskassette ersetzt, lediglich die beiden ITR Sequenzen bleiben erhalten (Abbildung 7B). Alle für die Replikation benötigten AAV- bzw. Adenoviralen Genprodukte werden bei der Vektor Produktion *in trans* zur Verfügung gestellt [90]. Abbildung 9 zeigt den Ablauf einer AAV Vektor Produktion. HEK293T Zellen werden hierfür mit drei verschiedenen Plasmiden ko-transfiziert: (a) ein AAV Vektor Plasmid, welches neben den ITRs auch die gewünschte Expressionskassette enthält, (b) ein Helfer-Plasmid, welche für die AAV Rep und Cap Leserahmen kodiert und (c) ein Adeno-Helferplasmid, welches für alle Adenoviralen Genprodukte kodiert, die für eine AAV Replikation benötigt werden. Im Anschluss an die Transfektion werden die HEK293T Zellen lysiert, da sich die AAV Partikel im Zytoplasma anreichern [100].

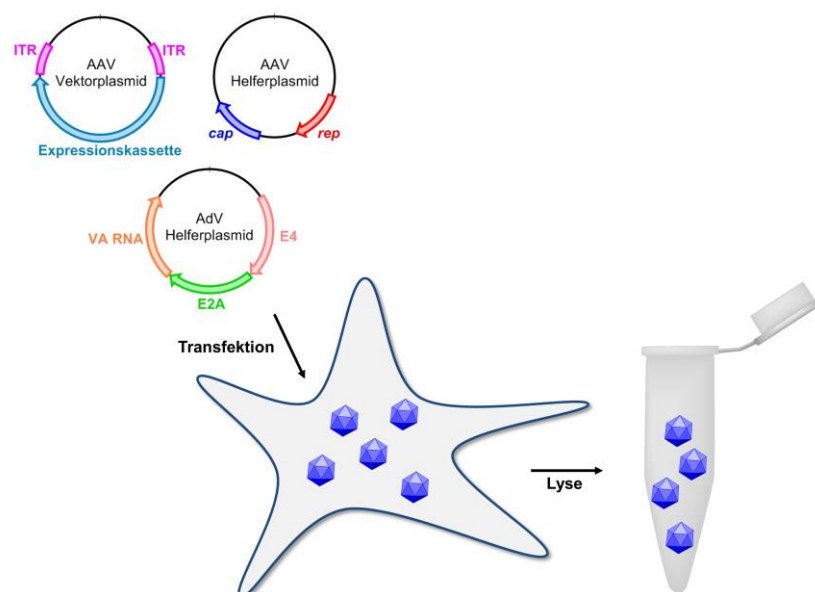


Abbildung 9: Ablauf der AAV Herstellung. HEK293T Kulturen werden mit drei Plasmiden

ko-transfiziert. Das AAV Vektorplasmid enthält zwei AAV ITR Sequenzen, die die gewünschte Expressionskassette flankieren. Das AAV Helferplasmid enthält Sequenzen für die gewünschten Kapsidproteine (*cap*) und die Sequenzen für alle 4 regulatorischen Proteine (*rep*). Das AdV Helferplasmid kodiert für die adenoviralen Proteine E2A und E4 und für die adenovirale long non-coding RNA VA. Nach der Transfektion findet in den HEK293T Kulturen eine aktive AAV Replikation statt und die AAV Vektoren können im Anschluss durch die Lyse der HEK293T Kulturen geerntet werden.

Grundsätzlich lassen sich zwei Formen von AAV Vektoren unterscheiden, die ssAAVs (*engl.* single-stranded AAV) und die scAAVs (*engl.* self-complementary AAVs). Bezogen auf ihre Replikation entsprechen ssAAVs den Wildtyp Viren und können somit ca. 5 kb an DNA verpacken. Bei self-complementary AAVs hingegen enthält der 3' ITR des Genoms entweder eine Mutation oder wurde durch den 3' ITR eines anderen Serotyps ersetzt [97]. Als Resultat kann während der Replikation an diesem ITR kein Einzelstrangbruch durch die Rep Proteine initiiert werden (Abbildung 8, [g]). Nach der Synthese des komplementären DNA Stranges, können die Rep Proteine nun am Wildtyp 5' ITR einen Einzelstrangbruch erzeugen (Abbildung 8, [h]). Letztendlich entsteht so ein neues AAV Genom, das aus einem ITR, einer Expressionskassette (blau), einem ITR, einer komplementären Expressionskassette (schwarz) und einem weiteren ITR besteht (Abbildung 8, [i]) [101,102]. Da ein AAV Kapsid maximal 5 kb DNA verpacken kann, darf die gewünschte Expressionskassette in einem scAAV nicht größer als 2,5 kb sein. Der Vorteil den scAAVs gegenüber ssAAVs bieten, ist, dass nach der Infektion einer Zelle durch einen scAAV das virale Genom sich selbstständig zu einem doppelsträngigen DNA Molekül zusammenlagern kann. Dieser Schritt muss bei ssAAVs durch zelluläre Polymerasen erfolgen. Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass scAAVs eine deutlich verbesserte Transduktionseffizienz als ssAAVs zeigen [103,104].

1.2.3.1 Vergleich von AAVs mit anderen viralen Vektoren

Unterschiedliche virale Vektoren bieten verschiedene Vor- und Nachteile bei der Transduktion von Zellen. Neben AAVs werden häufig auch Lentiviren oder Adenoviren als virale Vektoren verwendet. AAVs bieten eine Vielzahl an Vorteilen im Vergleich zu Adeno- bzw. Lentiviren:

(a) Im Vergleich zu Lentiviren integrieren AAVs ihr Transgen nicht in das Wirtsgenom, da die für die Integration benötigten AAV Proteine Rep78 und Rep68 weder im AAV Vektorgenom kodiert sind, noch bei der Herstellung in die Viren verpackt werden. Es kann also zu keinen Integrations-bedingten Mutationen im Wirtsgenom kommen [105,106].

(b) Während Adenoviren oft eine transiente Transgenexpression hervorrufen, ist für AAVs beschrieben worden, dass die Expression des Transgens langanhaltend ist [107].

(c) Die Transduktion mit Adenoviren führt oft zu starken antiviralen Effekten des Immunsystems *in vivo*. AAV Transduktionen hingegen rufen diese Effekte nicht hervor [108,109].

(d) Im Vergleich zu Lenti- und Adenoviren enthalten AAV Transgene lediglich die ITR Sequenzen des Wildtypvirus. Mögliche Rekombinationen, die eine erneute Virulenz des Vektors hervorrufen können, sind somit ausgeschlossen [110].

Ein weiterer Vorteil von AAVs ist, dass selbst Infektionen mit dem Wildtypvirus beim Menschen zu keinen Krankheitssymptomen führen. Außerdem sorgt die große Anzahl an verschiedenen Serotypen mit unterschiedlichen Tropismen dafür, dass es möglich ist Vektoren zu benutzen, die gezielt und effizient einen gewünschten Zelltyp transduzieren [111].

1.2.3.2 Kapsidmodifikationen

Die bereits hohe Anzahl an natürlichen AAV Serotypen kann noch weiter erhöht werden, indem Mutationen im AAV Kapsidgen eingeführt werden. Somit können AAV Vektoren mit spezifischen Transduktionseigenschaften erzeugt werden. Eine bewährte Methode hierfür ist das „Peptide Display“. Anhand des Kapsids von AAV2 konnte gezeigt werden, dass die Aminosäurepositionen 585-588 innerhalb des Kapsidproteins für die Bindung des Virus an eine Wirtszelle verantwortlich sind. Beim „Peptide Display“ werden nun in diese Stelle des AAV Genoms kurze (7-9 aa) Aminosäuremotive kloniert, die den Tropismus des Vektors verändern können. Dies ist mittlerweile nicht nur mit AAV2 möglich, sondern mit jedem AAV Serotyp, der identifiziert wurde. Somit erhöht sich die Menge an AAVs und es ist möglich nach AAVs mit bestimmten Eigenschaften zu screenen. AAVs können also auch benutzt werden, um HIV-inhibierende Sequenzen gezielt in bestimmte HIV Reservoirs einzubringen. [96,111,112].

1.3 Genomeditierung zur Inhibierung der HIV Replikation

Mit der ständigen Weiterentwicklung von Genomeditierungssystemen ist der Gedanke vorangetrieben worden latente virale Reservoirs mit Hilfe dieser Systeme zu inaktivieren, anstatt den Ansatz weiterzuverfolgen latente Proviren zu reaktivieren, um sie im Anschluss aus dem Körper von Patienten zu entfernen (1.1.5.2). Im Folgenden werden verschiedene Genomeditierungssysteme vorgestellt.

1.3.1 Vergleich verschiedener Genomeditierungssysteme

In Tabelle 2 sind einige Beispiele von verschiedenen Studien aufgeführt, die erfolgreich mit unterschiedlichen Genomeditierungssystemen HIV Proviren inaktiviert oder den Replikationszyklus auf zellulärer Seite inhibiert haben.

Tabelle 2: Verschiedene Genomeditierungssysteme und ihr Einsatz zur Inhibierung der HIV Replikation.

Genomeditierungssystem	Beschreibung	Quelle
Tre Rekombinase	Rekombinase, die in der Lage ist den 5' und den 3' HIV LTR zu binden und durch eine Rekombinationsreaktion den HIV Provirus zu entfernen	[85,113,114]
TALENs	• Verwendung zur Inaktivierung des HIV Ko-Rezeptors CCR5	[115]
	• Verwendung zur Inaktivierung des HIV Provirus	[86]
ZNF-Nuklease	• Verwendung zur Inaktivierung des HIV Ko-Rezeptors CCR5	[116,117]
	• Verwendung zur Inaktivierung des HIV Provirus	[87]
CRISPR/Cas9	• Verwendung zur Inaktivierung des HIV Ko-Rezeptors CCR5	[118,119]
	• Verwendung zur Inaktivierung des HIV Provirus	[88,120–122]

Die Tre Rekombinase leitet sich von der Cre Rekombinase ab. Die Cre Rekombinase ist in der Lage an bestimmte DNA Motive (=LoxP) zu binden und somit einzelne Gene, die von zwei LoxP Sequenzen in gleicher Orientierung flankiert sind, herauszuschneiden. Im Anschluss wird die DNA wieder zusammengefügt und das gewünschte Gen wurde entfernt [123]. Durch eine Reihe von *in vitro* Evolutionsschritten wurde die Cre Rekombinase so verändert, dass sie in der Lage ist LTR Sequenzen zu binden und folglich den zwischen den LTR Sequenzen liegenden HIV Provirus aus Zellen zu entfernen [113,114].

Bei TALENs und Zink-Finger Nukleasen handelt es sich in beiden Fällen um Fusionsproteine aus einer unspezifischen Endonuklease und einer DNA-Bindedomäne. Die DNA-Bindedomäne ist im Fall von Zink-Finger Nukleasen eine Abfolge an Aminosäuremotiven, die jeweils ein DNA-Basentriplett binden, während bei TALENs jedes

Aminosäuremotiv ein einzelnes Basenpaar bindet [124].

2012 wurde mit der Einführung des CRISPR/Cas9 Systems das Feld der Genom-Editierung grundlegend verändert. Im Vergleich zu Rekombinasen, ZNF-Nukleasen oder TALENs war es nun nicht mehr nötig eine ganze Proteindomäne zu entwerfen um eine spezifische DNA-Bindung und eine darauffolgende Genomeditierung durchzuführen. Stattdessen wird die DNA-Bindung bei CRISPR/Cas9 über ein RNA-Molekül erreicht, welches schnell und einfach entworfen werden kann (4.3.2). Im folgenden Abschnitt wird das CRISPR/Cas9 System detailliert erläutert.

1.3.2 Genomeditierung durch CRISPR/Cas9

Ursprünglich stammt das System aus Bakterien, in welchen es als Verteidigungsstrategie gegen Fremd-DNA eingesetzt wird. Übertragen auf die Forschung ist es heute eine effiziente und einfache Methode Gene in verschiedenen Organismen zu manipulieren (Abbildung 10; [125]).

Das CRISPR/Cas9 System besteht aus Cas9, einer DNA-Endonuklease, die auch RNA Moleküle binden kann und aus einer gRNA (*engl.* guide RNA). Die gRNA ist ein synthetisches RNA Molekül, das einerseits aus einem „scaffold“ Bereich besteht, der in der Lage ist an Cas9 zu binden und andererseits aus einer 20 nt langen Sequenz, die komplementär zum Genabschnitt, welcher modifiziert werden soll, entworfen werden kann. Werden sowohl Cas9 als auch die gRNA in der gleichen Zelle exprimiert, so bindet die gRNA an Cas9, was eine Konformationsänderung innerhalb von Cas9 zur Folge hat. Cas9 ist nun in der Lage an DNA zu binden. Der Cas9/gRNA Komplex bindet nun an DNA Bereiche innerhalb des Genoms, die ein sogenanntes PAM (*engl.* Protospacer Adjacent Motif) enthalten. Das PAM ist eine DNA Sequenz, die Cas9 benötigt, um an DNA binden zu können. Die Sequenz des PAMs ist abhängig von der Bakterienart, aus der das verwendete Cas9 Enzym isoliert wurde. Für Cas9 aus *Streptococcus pyogenes* ist die PAM Sequenz NGG, wobei N eine beliebige Base darstellt. Sobald Cas9 an ein PAM gebunden hat, das an eine zur gRNA komplementären Sequenz grenzt, erzeugt Cas9 genau 3 Basenpaare upstream des PAMs einen Doppelstrangbruch in der DNA [125–128].

Doppelstrangbrüche innerhalb einer Zelle können durch zwei verschiedene Mechanismen repariert werden: Homologe Reparatur Mechanismen (*engl.* Homology-Directed Repair, HDR) oder Nicht-Homologe Reparatur Mechanismen (*engl.* Nonhomologous End Joining, NHEJ). Beim HDR wird der Doppelstrangbruch beinahe fehlerfrei repariert, da das Schwesterchromosom als Vorlage für die Reparatur dient. Fehlt diese Vorlage werden Doppelstrangbrüche über den NHEJ Weg repariert. Hierbei entsteht eine Vielzahl von Fehlern, die sich durch den Einbau von kleinen Insertionen, Deletionen oder

Punktmutationen äußern können. Obwohl durch NHEJ der Doppelstrangbruch repariert werden kann, so kann es dennoch passieren, dass der reparierte Genabschnitt im Anschluss nicht mehr funktionsfähig ist [129]. Dieser Umstand wird durch den Einsatz von CRISPR/Cas9 ausgenutzt, um Gene gezielt auszuschalten. Neben der Eigenschaft Gene auszuschalten, können modifizierte CRISPR/Cas9 Konstrukte auch benutzt werden, um die Expression von Genen anzuschalten oder lediglich für eine kurze Zeit zu inhibieren [130].

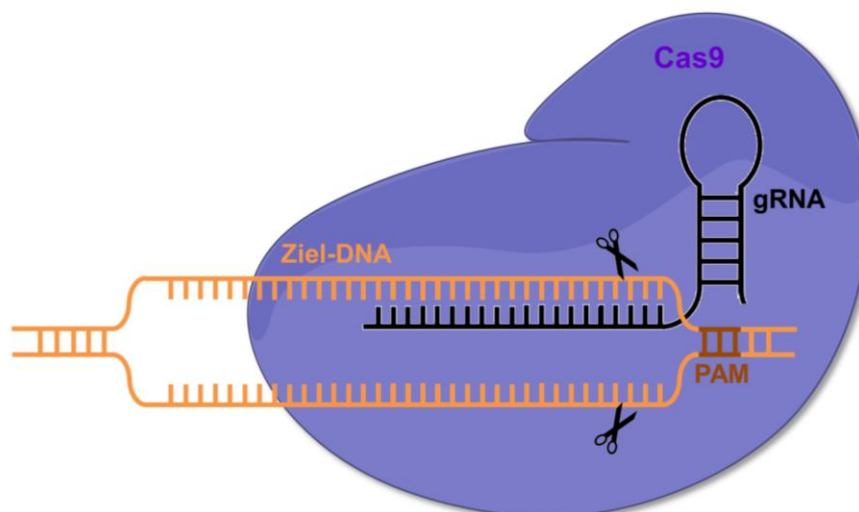


Abbildung 10: Schematischer Ablauf der Genomeditierung durch CRISPR/Cas9. Werden sowohl die Endonuklease Cas9 als auch die zur Ziel-DNA komplementäre gRNA in der gleichen Zelle exprimiert, so bindet die gRNA an Cas9. Der Cas9/gRNA Komplex bindet nun an Sequenzen des zellulären Genoms, die ein PAM enthalten. Wenn auf die PAM Sequenz eine Ziel-DNA Sequenz folgt, die exakt komplementär zur gRNA ist, dann induziert Cas9 einen Doppelstrangbruch drei Basenpaare upstream des PAMs. Die Zelle ist nun in der Lage diesen Doppelstrangbruch entweder durch homologe oder nicht-homologe Reparatur Mechanismen zu reparieren. Auf diese Weise ist es möglich verschiedenste DNA Mutationen innerhalb der Ziel-DNA hervorzurufen.

Die Fähigkeit von CRISPR/Cas9 Gene dauerhaft zu inaktivieren, wurde schnell als Möglichkeit erkannt latente Infektionen von verschiedenen Viren zu bekämpfen (humanes Papillomavirus, Hepatitis B Virus, Epstein-Barr Virus, [131]). Auch latente HIV Infektionen bieten ein gutes Ziel für CRISPR/Cas9. Es gibt eine Vielzahl von Studien (Tabelle 2), die die erfolgreiche Inaktivierung von HIV Proviren in unterschiedlichen Zellsystemen belegen (verschiedene Reporterzelllinien, T-Zelllinien, Monozyten und Makrophagen). In den meisten Studien wurde das CRISPR/Cas9 System entweder durch Transfektion oder durch lentivirale Transduktion in die Zelle eingeführt, was die grundsätzliche Durchführbarkeit des Ansatzes belegt, aber entweder keine geeignete Methode für *in vivo* Studien ist oder ein zu

großes Risiko für ungewollte Insertions-bedingte Mutationen im Wirtsgenom darstellt. Trotzdem stellt das CRISPR/Cas9 System einen vielversprechenden Ansatz zur Bekämpfung von latenten HIV Infektionen in verschiedenen Reservoirien dar [88,120–122,132].

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung eines AAV-basierten Vektors, der in der Lage ist effizient neurale Progenitorzellen und vor allem Astrozyten zu transduzieren. Hierfür sollten nicht nur natürliche AAV Serotypen analysiert werden, sondern auch modifizierte AAVs. Nach der Identifikation eines geeigneten Vektors sollten dessen Transduktionseigenschaften genauer untersucht werden. Hierzu zählten die Fähigkeit des Vektors eine Langzeit-Transgenexpression zu vermitteln und die Frage, wie spezifisch der Vektor für die Transduktion von neurale Progenitorzellen und Astrozyten ist. Die Spezifität eines Vektors lässt sich auch durch den Einsatz eines zellspezifischen Promotors erhöhen. Es sollten daher verschiedene Promotoren auf ihre Fähigkeit eine auf neurale Progenitorzellen und Astrozyten limitierte Transgenexpression zu vermitteln, getestet werden. Die Spezifität des Vektors sollte dabei sowohl in Einzelzellsystemen als auch in gemischten Zellpopulationen getestet werden.

Nach der Identifikation und Charakterisierung eines geeigneten Vektors sollte des Weiteren analysiert werden, ob der Vektor dazu verwendet werden kann HIV-inhibierende Sequenzen in verschiedene HIV-Zellsysteme einzubringen. Als HIV-inhibierende Sequenzen wurden zum einen der zelluläre HIV Restriktionsfaktor 16.4.1 und zum anderen das Genom-Editierungssystem CRISPR/Cas9 verwendet. Für die Verwendung von CRISPR/Cas9 ist das Entwerfen von gRNAs nötig. In dieser Arbeit sollten daher gRNAs entworfen werden, die an für die HIV Transkription wichtige Elemente des HIV LTRs binden und gleichzeitig ein geringes Risiko aufweisen an andere DNA Sequenzen zu binden. Der Effekt von CRISPR/Cas9 auf die HIV Infektion sollte auf verschiedenen Ebenen untersucht werden (provirale DNA, RNA- und Proteinebene).

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

In dieser Arbeit verwendete Puffer (6.1), Chemikalien (6.2), Verbrauchsmaterialien (6.3) und Geräte (6.4) sind im Anhang aufgelistet.

2.1.1 Medien

Tabelle 3: Kulturmedien für alle in dieser Arbeit verwendeten Zellen.

<i>Medien für die Vermehrung von Bakterien</i>	
LB-Medium	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl pH 7,0
LB-Agar	LB-Medium mit 15 g/l Agar
SOC Medium	20 g/l Trypton 10 g/l Hefeextrakt 0,5 g/l NaCl 2,5 mM KCl 20 mM Glukose pH 7,0
<i>Humane Zellkulturmedien</i>	
Proliferationsmedium HNSCs	DMEM F12 1:1 mit GlutaMAX-I 1% BSA 1x N2-Supplement 5 mM Hepes 0,5% FKS 1% Penicillin/Streptomycin Lösung (PenStrep) 20 ng/ml FGF-2 20 ng/ml EGF
Differenzierungsmedium HNSCs	DMEM F12 1:1 mit GlutaMAX-I 1% BSA 1x N2-Supplement 5 mM Hepes 0,5% FKS 1% Penicillin/Streptomycin Lösung (PenStrep)
Zellkulturmedium für adhärente Zellen	DMEM (+4,5 g D-Glukose, +25 mM Hepes,

	+L-Glutamin) 10% FKS 1% Penicillin/Streptomycin Lösung (Anti-Anti) 1 x Natriumpyruvat
Zellkulturmedium für Suspensionszellen	VLE RPMI 1640 10% FKS 1% Penicillin/Streptomycin Lösung

HNSC.100 und HNSC.LatGFP1.2 Zellen wurden entweder in Proliferationsmedium oder Differenzierungsmedium kultiviert. Jurkat Zellen und PBMCs wurden im Zellkulturmedium für Suspensionszellen kultiviert. Alle anderen Zelllinien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden im Zellkulturmedium für adhärenzte Zellen kultiviert, lediglich hiPSC Zellen und davon abgeleitete Zellen wurden in anderen Medien kultiviert (siehe Abschnitt 6.6).

2.1.2 Kits

Tabelle 4: Alle Kits, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind zusammen mit dem jeweiligen Hersteller/Lieferant aufgeführt.

Kit	Hersteller/Lieferant
HIV-1 p24 Antigen Capture Assay	Advanced Bioscience Laboratories
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche
MiSeq Reagen Kit v2 (300 cycles)	Illumina
Nextera Index Kit (24 indexes, 96 samples)	Illumina
NucleoBond® Xtra Maxi	Macherey-Nagel
NucleoSpin® Gel und PCR Clean-up	Macherey-Nagel
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen

2.1.3 Oligonukleotide

Tabelle 5: Die Tabelle listet alle verwendeten Oligonukleotide auf. Die Sequenz ist in 5' → 3' Orientierung aufgeführt. Unter Bemerkungen befinden sich Referenzen, aus denen die Sequenzen ursprünglich stammen, oder Software/Online Tools mit denen Oligonukleotide selbst entworfen wurden. Unterstrichene Sequenzen zeigen von Illumina vorgegebene Adaptorsequenzen an. Oligonukleotide für gRNAs (gRNA 1-6; Luc) sind in groß geschriebene Bereiche (= eigentliche gRNA) und klein geschriebene Bereiche (=

Überhänge, die für Klonierung benötigt werden) aufgeteilt. Alle Oligonukleotide wurden über Metabion bestellt.

Name	Sequenz (5'→3')	Bemerkungen
AAV-Titer fw	TCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGG	[133]
AAV-Titer rv	CACTAGGGGGTTCCTAGATCTCTCCC	[133]
GFAP Sall fw	CAGTCGACGCTCGGTACCAGA	SerialCloner 2.6.1
GFAP Swal rv	ACATTTAAATCTCCAACCTGCTCT	SerialCloner 2.6.1
GFAP _{EcoRI} fw	ACGAATTCGCTCGGTACCAGATCT	SerialCloner 2.6.1
GFAP _{BspEI} rv	ACTCCGGACTCCAACCTGCTCT	SerialCloner 2.6.1
Nes714Sall fw	CAGTCGACGATCAGACTGCTAGAGATC	SerialCloner 2.6.1
Nes714Swal rv	ACGATTTAAATGCGGCCGCGGGTA	SerialCloner 2.6.1
16.4.1 XhoI fw	GATCTCGAGATGGCTAGCTTTCCTGCTCT	SerialCloner 2.6.1
16.4.1 Age rv	ATACCGGTACTGGCCTCCAAAGGCATTC	SerialCloner 2.6.1
qPCR_YFPfw	TTCTGCTTGTCGGCCATGAT	Primer BLAST
qPCR_YFPrv	AGGACGACGGCAACTACAAG	Primer BLAST
T7 fw	ATCCTTGATCTGTGGATCTACCA	SerialCloner 2.6.1
T7 rv	TCCTTTGATGCACACAATAGAGG	SerialCloner 2.6.1
MiSeqRv	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAG <u>ACAGATTGAGGCTTAAGCAGTGGG</u>	SerialCloner 2.6.1
MiSeqLAI	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAA <u>CAGGAGAGAGAAGTGTTAGAGTGGA</u>	SerialCloner 2.6.1
MiSeqNL43	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAA <u>CAGACCCGGAGGGAGAAGTATTAG</u>	SerialCloner 2.6.1
gRNA 1 fw	caccGTACTCCGGATGCAGCTCTC	Genome Engineering 4.0
gRNA 1 rv	aaacAGTACAGGCAAAAAGCAGCT	Genome Engineering 4.0
gRNA 2 fw	caccGGGGACTTTCCAGGGAGGTG	Genome Engineering 4.0
gRNA 2 rv	aaacCACCTCCCTGGAAAGTCCCC	Genome Engineering 4.0
gRNA 3 fw	caccGCCACTCCCCAGTCCCGCCC	Genome Engineering 4.0
gRNA 3 rv	aaacGGGCGGGACTGGGGAGTGGC	Genome Engineering 4.0
gRNA 4 fw	caccGCCTGGGCGGGACTGGGGAG	Genome Engineering 4.0
gRNA 4 rv	caaaCTCCCCAGTCCCGCCCAGGC	Genome Engineering 4.0
gRNA 5 fw	caccAGCTGCTTTTTGCCTGTACT	Genome Engineering 4.0
gRNA 5 rv	aaacAGTACAGGCAAAAAGCAGCT	Genome Engineering 4.0
gRNA 6 fw	caccACGCCAAAAATTTTGACTAG	Genome Engineering 4.0

gRNA 6 rv	aaacCTAGTCAAAATTTTTGGCGT	Genome Engineering 4.0
Luc fw	caccGATAACTGGTCCGCAGTGGT	Genome Engineering 4.0
Luc rv	aaacACCACTGCGGACCAGTTATC	Genome Engineering 4.0
HIV fw	GTGTGTGGTAGATCCACAGATCAAGG	[134]
HIV rv	CCAGTCACACCTCAGGTACCTTTAAGACC	[134]
Pol fw	GCACCACGTCCAATGACA	[135]
Pol rv	GTGCGGCTGCTTCATAA	[135]
BK1F	GTAATACCCATGTTTTTCAGCATTATC	[136]
BK1R	TCTGGCCTGGTGCAATAGG	[136]
β-globin fw	ACACAACTGTGTTCCTAGC	[136]
β-globin rv	CAACTTCATCCACGTTCCACC	[136]

2.1.4 gRNAs

Tabelle 6: Guide RNAs wurden mit dem Online Tool aus Hsu *et al.*, 2013 ([127]; <http://www.genome-engineering.org>) entworfen und binden sowohl im LTR von HIV-1 LAI als auch von HIV-1 NL4-3. Die gRNA Luc wurde als Negativkontrolle entworfen und bindet innerhalb der Renilla Luciferase. Alle gRNAs sind in 5' → 3' Orientierung aufgeführt.

Name	Sequenz (5'→3')
1	GTACTCCGGATGCAGCTCTC
2	GGGGACTTTCCAGGGAGGTG
3	GCCACTCCCCAGTCCCGCCC
4	GCCTGGGCGGGACTGGGGAG
5	AGCTGCTTTTTGCCTGTACT
6	ACGCCAAAAATTTTGACTAG
Luc	GATAACTGGTCCGCAGTGGT

2.1.5 Plasmide

pUC18

Das pUC18 Plasmid ist ein Klonierungsplasmid mit einer MCS (= multiple cloning site), welche eine Vielzahl an Schnittstellen für verschiedene Restriktionsenzyme besitzt. Das Plasmid enthält keine Protein-kodierende Sequenzen in der MCS und wurde für mock Transfektionen benutzt (Addgene 50004).

pLVTHM

Ein lentivirales Plasmid der 2. Generation, welches benutzt werden kann um shRNAs oder

cDNAs in einem lentiviralem Vektor zu verpacken. Die Expression von shRNAs steht unter der Kontrolle des H1 Promotors, während die Expression von cDNAs unter der Kontrolle eines EF1- α Promotors steht. Das Plasmid war ein Geschenk von Didier Trono (Addgene 12247).

pGfaABC1D-nLac

Expressionsplasmid für *LacZ* Gen unter der Kontrolle des gfaABC₁D Promotors. Der gfaABC₁D Promotor ist ein minimaler Promotor abgeleitet vom humanen Promotor für die Expression des Astrozytenmarkers GFAP (*engl.* Glial fibrillary acidic protein). Der gfaABC₁D Promotor hat eine Größe von 681 bp [137]. Das Plasmid war ein Geschenk von Michael Brenner (Addgene 53131).

nes714tk/lacZ

Expressionsplasmid für *LacZ* Gen unter der Kontrolle des HSV tk Promotors (Herpes Simplex Virus Thymidin Kinase). Unmittelbar vor dem HSV tk Promotor befindet sich ein 714 bp Fragment des zweiten Introns des humanen Nestingens, welches eine zellspezifische Expression in neuronalen Progenitorzellen ermöglichen soll [138]. Das Plasmid war ein Geschenk von Urban Lendahl (Addgene 47614).

pLAI.2

Das Plasmid enthält den kompletten Provirus des HIV-1 Stamms LAI ([139]; NIH AIDS Reagents 2532).

pC16.4.1sg143

Expressionsplasmid für 16.4.1-GFP (sg143) unter der Kontrolle eines CMV Promotors [83].

pSSV9

Dieses Plasmid enthält ein komplettes Wildtyp AAV2 Genom [140]. Es war ein Geschenk von Dirk Grimm (Bioquant Heidelberg).

pBSU6

Dieses Plasmid wird für die Herstellung von scAAVs benutzt. Es enthält ein EYFP Reporter unter der Kontrolle eines CMV Promotors. Flankiert wird die Expressionskassette von einem AAV2 ITR und einem AAV4 ITR. Dieses Plasmid war ein Geschenk von Dirk Grimm (Bioquant Heidelberg; [141]).

pHelper

Das Plasmid kodiert für die adenoviralen Proteine E2A und E4 und für die adenovirale long non-coding RNA VA. Alle drei Elemente werden zur Herstellung von AAV Vektoren in

HEK293T benötigt. Dieses Plasmid war ein Geschenk von Dirk Grimm (Bioquant Heidelberg).

pRep2Cap2

Das Plasmid enthält einen Leserahmen für AAV2 Rep Proteine (Rep78, Rep68, Rep52, Rep40) und einen für AAV2 Cap Proteine (VP1, VP2, VP3). Das Plasmid wird für die Herstellung von AAV Vektoren, deren Hülle von AAV2 abgeleitet ist, benötigt. Dieses Plasmid war ein Geschenk von Dirk Grimm (Bioquant Heidelberg).

pRep2Cap1

Plasmid enthält einen Leserahmen für AAV2 Rep Proteine und einen für AAV1 Cap Proteine. Das Plasmid wird für die Herstellung von AAV Vektoren, deren Hülle von AAV1 abgeleitet ist, benötigt. Dieses Plasmid war ein Geschenk von Dirk Grimm (Bioquant Heidelberg).

pRep2Cap9P1

Plasmid enthält einen Leserahmen für AAV2 Rep Proteine und einen für AAV9 Cap Proteine, welche ein 7-mer langes, synthetisches Peptid (P1) integriert haben. Das Plasmid wird für die Herstellung von AAV9P1 Vektoren benötigt. Dieses Plasmid war ein Geschenk von Dirk Grimm (Bioquant Heidelberg).

pSSV9_shortCMV-Cas9

Dieses Plasmid basiert auf dem AAV Plasmid pSSV9 und wird für die Produktion von ssAAVs benötigt. Es enthält einen verkürzten CMV Promotor, der die Expression der Nuklease Cas9 (*Streptococcus pyogenes*) antreibt. Dieses Plasmid war ein Geschenk von Dirk Grimm (Bioquant Heidelberg).

pSSV9_shortCMV_Cas9_H1gRNA

Dieses Plasmid basiert auf dem AAV Plasmid pSSV9 und wird für die Produktion von ssAAVs benötigt. Es enthält einen verkürzten CMV Promotor, der die Expression der Nuklease Cas9 (*Streptococcus pyogenes*) antreibt. Zusätzlich enthält es eine Expressionskassette für gRNAs, bestehend aus dem RNA-Polymerase III Promotor H1, zwei BsmBI Klonierungsschnittstellen und einer scaffold RNA [142]. Dieses Plasmid war ein Geschenk von Dirk Grimm (Bioquant Heidelberg).

pSSV9_shortCMV_Cas9_U6gRNA

Dieses Plasmid basiert auf dem AAV Plasmid pSSV9 und wird für die Produktion von ssAAVs benötigt. Es enthält einen verkürzten CMV Promotor, der die Expression der Nuklease Cas9 (*Streptococcus pyogenes*) antreibt. Zusätzlich enthält es eine

Expressionskassette für gRNAs, bestehend aus dem RNA-Polymerase III Promotor U6, zwei BsmBI Klonierungsschnittstellen und einer scaffold RNA [142]. Dieses Plasmid war ein Geschenk von Dirk Grimm (Bioquant Heidelberg).

pSSV9_shortCMV_Cas9_7SKgRNA

Dieses Plasmid basiert auf dem AAV Plasmid pSSV9 und wird für die Produktion von ssAAVs benötigt. Es enthält einen verkürzten CMV Promotor, der die Expression der Nuklease Cas9 (*Streptococcus pyogenes*) antreibt. Zusätzlich enthält es eine Expressionskassette für gRNAs, bestehend aus dem RNA-Polymerase III Promotor 7SK, zwei BsmBI Klonierungsschnittstellen und einer scaffold RNA [142]. Dieses Plasmid war ein Geschenk von Dirk Grimm (Bioquant Heidelberg).

Tabelle 7: Plasmide, die in dieser Arbeit kloniert wurden, sind zusammen mit dem entsprechenden Ziel-Plasmid, Insert, den verwendeten Restriktionsenzymen und einer Beschreibung aufgelistet. * Die dazugehörige Plasmidkarte befinden sich im Anhang unter Abschnitt 6.5.

Name	Ziel-Plasmid	Insert	Enzyme	Beschreibung
pLVTHM_gfaABC ₁ D*	pLVTHM	gfaABC ₁ D Promotor aus pGfaABC ₁ D-nLac	Sall, SwaI	Zur Herstellung von lentiviralen Vektoren; Expression eines GFP Reporters unter der Kontrolle des gfaABC ₁ D Promotors
pLVTHM_Nes714*	pLVTHM	Nes714 Intron aus nes714tk/lacZ	Sall, SwaI	Zur Herstellung von lentiviralen Vektoren; Expression eines GFP Reporters unter der Kontrolle des Nes714 Introns
pBSU6_gfaABC ₁ D-EYFP*	pBSU6	gfaABC ₁ D Promotor aus pGfaABC ₁ D-nLac	EcoRI, BspEI	Zur Herstellung von scAAVs; Expression eines EYFP Reporters unter der Kontrolle des gfaABC ₁ D Promotors
pBSU6_16.4.1-EYFP	pBSU6	16.4.1 aus pC16.4.1sg143	XhoI, AgeI	Zur Herstellung von scAAVs; Fusionsprotein aus 16.4.1 und EYFP unter der Kontrolle eines CMV Promotors
pBSU6_gfaABC ₁ D-16.4.1-EYFP*	scAAV_16.4.1	gfaABC ₁ D Promotor aus pGfaABC ₁ D-nLac	EcoRI, BspEI	Zur Herstellung von scAAVs; Fusionsprotein aus 16.4.1 und EYFP unter der Kontrolle des gfaABC ₁ D Promotors
pSSV9_shortCMV_Cas9_H1x	pSSV9_shortCMV_Cas9_H1gRNA	x = gRNA 1-6	BsmBI	Zur Herstellung von ssAAVs; Expression verschiedener gRNAs unter der Kontrolle von H1 Promotor
pSSV9_shortCMV_Cas9_U6gx	pSSV9_shortCMV_Cas9_U6gRNA	x = gRNA 1-6	BsmBI	Zur Herstellung von ssAAVs; Expression verschiedener gRNAs unter der Kontrolle von U6 Promotor
pSSV9_shortCMV_Cas9_7SKx	pSSV9_shortCMV_Cas9_7SKgRNA	x = gRNA 1-6; Luc	BsmBI	Zur Herstellung von ssAAVs; Expression verschiedener gRNAs unter der Kontrolle von 7SK Promotor

2.1.6 Prokaryotische Zellen

XL10-Gold

Chemisch kompetente *E. coli* Zellen (Stamm: XL10-Gold), die für Transformationen von neu ligierten Plasmiden verwendet wurden (Agilent).

DH5αTM

Chemisch kompetente *E. coli* Zellen (Stamm: DH5α), die für die Re-Transformation von Plasmiden benutzt wurden (ThermoFisher Scientific).

Stbl2TM

Chemisch kompetente *E. coli* Zellen (Stamm: Stbl2), die für die Transformation und Re-Transformation von lentiviralen Plasmiden verwendet wurden. Aufgrund ihres Genotyps eignen sich diese Zellen dazu Plasmide mit repetitiven Sequenzen (LTRs) zu vermehren (ThermoFisher Scientific).

2.1.7 Humane Zellen

CHME-3

Hierbei handelt es sich um humane Mikrogliazellen, die durch Transfektion mit dem SV40 large T Antigen immortalisiert wurden [143].

HEK293T

Bei diesen Zellen handelt es sich um humane embryonale Nierenzellen (*engl.* human embryonic kidney). Ursprünglich stammen sie von HEK293 Zellen ab und wurden dann mit dem SV40 large T Antigen immortalisiert (ATCC[®] CRL-3216TM; [144]).

HeLa

HeLa Zellen sind humane Epithelzellen, die von einem Cervixkarzinom abgeleitet sind (ATCC[®] CCL-2TM; [145]).

HepG2

Diese Zelllinie leitet sich von humanen Hepatozyten ab, die aus einem Leberkarzinom isoliert wurden (ATCC[®] HB-8065TM; [146]).

hiPSC (*engl.* human induced pluripotent stem cells)

Diese Zellen wurden aus humanen Vorhaut-Fibroblasten erzeugt. Hierfür wurden die Zellen mittels wiederholter Transfektionen mit einem mRNA Mix (bestehend aus mRNAs verschiedener Transkriptionsfaktoren) auf das Stadium von pluripotenten Stammzellen reprogrammiert. Die Zellen waren ein freundliches Geschenk von Dr. Micha Drukker (Institut für Stammzellforschung, Helmholtz Zentrum München) und wurden im Labor von Dr.

Sabrina Desbordes (Institut für Entwicklungsgenetik, Helmholtz Zentrum München) zu verschiedenen Zellen des ZNS differenziert. Die von hiPSC-abgeleiteten neuronalen Progenitorzellen, wurden im Anschluss zu Astrozyten und kortikalen Neuronen differenziert. Detaillierte Protokolle zur Herstellung der Zellen sind im Abschnitt 6.6 zu finden.

HNSC.100

Hierbei handelt es sich um humane, fetale Progenitorzellen, die mit Hilfe des Onkogens v-myc immortalisiert wurden. Die Zellen können sowohl als proliferierende neurale Progenitorzellen, als auch als differenzierte Astrozyten-angereicherte Zellpopulationen kultiviert werden [147,148].

HNSC.LatGFP1.2

Basierend auf den HNSC.100 Zellen enthalten HNSC.LatGFP1.2 Zellen ein integriertes HIV Provirus des Stammes NL4-3. Das Provirus wird nicht exprimiert (= latent) und enthält im *Env* ein integriertes *GFP* Gen, womit eine Replikation des Provirus ausgeschlossen ist. Durch Behandlung der Zellen mit TNF- α (10 ng/ml) für 30 h kann das Provirus reaktiviert werden und die HIV Expression kann durch ansteigenden mRNA Level und die Expression von GFP beobachtet werden [149].

Huh-7

Wie auch bei den HepG2 Zellen handelt es sich hier um humane Hepatozyten aus einem Leberkarzinom [150].

Jurkat

Hierbei handelt es sich um T-Zellen, die aus peripherem Blut eines Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie abstammen. Jurkat Zellen werden in Suspension kultiviert (DSZM ACC 282; [151]).

LAN-5

Diese Zellen stammen aus einem humanen Neuroblastom und dienen als Modell für neuronale Zellen (DSZM ACC 673; [152]).

LC5-RIC

LC5-RIC Zellen leiten sich von LC5-CD4 Zellen ab. LC5-CD4 Zellen sind ein HeLa basiertes Zellsystem, das stabil den zellulären Oberflächenrezeptor CD4 exprimiert. Geneticin wird hierbei als Selektion benutzt [153]. LC5-RIC Zellen wurden zusätzlich stabil mit dem Plasmid pLRED(2xIns)R transfiziert, wodurch ein LTR-abhängiger dsRed Reporter integriert wurde. Die Expression von dsRed ist nur in Gegenwart der viralen Proteine Tat und Rev möglich.

Selektion auf das pLRED(2xIns)R Konstrukt wird durch eine HygromycinB Resistenz ermöglicht [154].

PBMC (*engl.* peripheral blood mononuclear cell)

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes wurden aus Buffy Coats (bayrisches Rotes Kreuz) isoliert. Um PBMCs zu stimulieren wurden sie für drei Tage mit 20 U/ml hIL-2 und 1 µg/ml PHA behandelt. Die Präparation und Stimulierung von PBMCs wurde von Johanna Götz (Institut für Virologie, Helmholtz Zentrum München) durchgeführt. Ein detailliertes Protokoll zur Isolierung von PBMCs aus Buffy Coats ist unter Abschnitt 6.7 zu finden.

Organoide

Organoide bestehend aus Astrozyten und kortikalen Neuronen wurden im Labor von Dr. Sabrina Desbordes (Institut für Entwicklungsgenetik, Helmholtz Zentrum München) hergestellt. Für die Herstellung wurden hiPSC so kultiviert, dass sie EBs (=embryonic bodies) mit einem Durchmesser von 500-600 µm bilden. Im Anschluss wurde durch Zugabe von verschiedenen Wachstumsfaktoren die Differenzierung der Zellen zu Neuronen und Astrozyten induziert. Das genaue Protokoll zur Herstellung von Organoiden ist im Abschnitt 6.6 zu finden.

TH4-7-5

Bei TH4-7-5 handelt es sich um eine persistent HIV infizierte Astrozytenzelllinie. Hergestellt wurden TH4-7-5 Zellen durch die Infektion von 85HG66 Astrozytomzellen mit HIV_{IIIb} [155].

U-251MG, U-87MG

Beide Zelllinien wurden aus einem humanen Glioblastom isoliert und dienen als Astrozytenmodell (ECACC 09063001; ATCC[®] HTB-14TM; [156]).

2.1.8 Antikörper

Tabelle 8: Alle verwendeten Antikörper sind zusammen mit dem jeweiligen Hersteller, der eingesetzten Verdünnung der Antikörper-Stocklösung in 1xPBS + 5% BSA und der Anwendung (IF = Immunfluoreszenzfärbung) aufgelistet.

Antikörper	Lieferant/Hersteller	Verdünnung
anti-Ki-67; Kaninchen	Thermo Fisher Scientific	1:400 (IF)
anti-GFAP; Ziege	Thermo Fisher Scientific	1:500 (IF)
anti-S100beta; Kaninchen	Thermo Fisher Scientific	1:200 (IF)
anti-Nestin; Kaninchen	Zur Verfügung gestellt von Dr. Eugene Major, NINDS, NIH [157]	1:1000 (IF)
anti-beta III tubulin; Maus	Thermo Fisher Scientific	1:500 (IF)

anti- Kaninchen Alexa 488	Thermo Fisher Scientific	1:200 (IF)
anti-Ziege Alexa 568	Thermo Fisher Scientific	1:400 (IF)
anti- Kaninchen Alexa 568	Thermo Fisher Scientific	1:400 (IF)
anti-Maus Alexa 647	Thermo Fisher Scientific	1:400 (IF)
anti-Maus Alexa 546	Thermo Fisher Scientific	1:400 (IF)

2.1.9 Software und Online Tools

Tabelle 9: Auflistung an Software/ Online Tools zusammen mit Hersteller/Lieferant.

Name	Hersteller/Lieferant
BLAST	NCBI
BLAT	UCSC Genome Bioinformatics
Diva	BD Biosciences
Genome Engineering 4.0	Zhang Lab, MIT
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc.
i-control™ Software	Tecan Group
LightCycler® 480 Software (Version 1.5.0.39)	Roche
Mega7	Kumar <i>et al.</i> , 2016 [158]
Microsoft Office 2010	Microsoft Corp.
nanoDrop 2000c	Thermo Scientific
Primer BLAST	NCBI
Quantity One Vers. 241 Build 008	BioRad
R	The R Foundation
SerialCloner 2.6.1	Serial Basic
Unipro UGENE 1.24.2	Okonechnikov <i>et al.</i> , 2012 [159]
Volocity® 6.3	Perkin Elmer Inc.

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Auftauen und Einfrieren von humanen Zellen

Um humane Zellen langfristig zu lagern, wurden diese eingefroren. Dafür wurden vom gewünschten Zelltyp $5 \cdot 10^6$ Zellen abgezählt (2.2.2) und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden bei 200 g für 5 min zentrifugiert und anschließend mit 1x PBS gewaschen. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 1 ml Einfriermedium (Zellspezifisches Medium + 10% FKS + 10% DMSO) resuspendiert, in ein 2 ml Kryogefäß überführt und anschließend bei -80 °C eingefroren. Für Langzeitlagerung

wurden die Zellen in einen Stickstofftank überführt.

Um Zellen nach dem Einfrieren wieder in Kultur zu nehmen, wurden die gefrorenen Kryogegefäße im Brutschrank bei 37 °C aufgetaut und die Zellen wurden in 5 ml frisches Kulturmedium überführt. Nach einer Zentrifugation bei 200 g für 5 min wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet wurde in frischem Medium aufgenommen bevor es in eine geeignete Zellkulturflasche überführt wurde.

2.2.2 Kultivierung und Aussaat von humanen Zellen

Alle humanen Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca. 95% kultiviert. Für die Kultivierung wurden Zellkulturflaschen unterschiedlicher Größen verwendet (T75 oder T175). Zweimal pro Woche wurde unter dem Mikroskop die Dichte der Zellen überprüft und die Zellen wurden in angemessenen Verhältnissen passagiert. Bei adhären Zellen wurde das Medium abgenommen und die Zellen wurden mit 10 ml 1x PBS gewaschen. Nach Zugabe von 1 ml 0,5% Trypsin, wurden die Zellen für 2-3 min im Brutschrank inkubiert, bevor die Zellen in 9 ml frischem Medium abgespült und damit vereinzelt wurden. Ein Aliquot, entsprechend der gewünschten Verdünnung, wurde zusammen mit frischem Medium in eine Zellkulturflasche gegeben und die Zellen wurden im Brutschrank inkubiert. Bei Suspensionszellen wurde ein Teil des alten Mediums inkl. Zellen abgenommen und durch frisches Medium ersetzt.

Für die Durchführung verschiedener Experimente wurden die Zellen in Zellkulturschalen verschiedener Größen ausgesät. Hierfür wurden die Zellen wie beim Passagieren geerntet und nach Aufnahme in frischem Medium in einer Zählkammer ausgezählt. 10 µl der Zellsuspension wurden in eine Kammer gegeben und es wurden unter dem Mikroskop 3 Großkammern ausgezählt. Der errechnete Mittelwert aus den 3 Großkammern wurde mit $1 \cdot 10^4$ multipliziert und ergab somit die Zellzahl/ml. Abhängig von dem Zelltyp wurden unterschiedliche Zellzahlen ausgesät (Tabelle 10).

Tabelle 10: Zellzahl, die in entsprechenden Zellkulturschalen ausgesät wurde in Abhängigkeit der Zelllinie.

Zelltyp	6-well	12-well	24-well	48-well	96-well
CHME-3, HEK293T, HeLa, HepG2, HuH-7, Lan-5, LC5-RIC	$2 \cdot 10^5$ /well	$1 \cdot 10^5$ /well	$5 \cdot 10^4$ /well	$3 \cdot 10^4$ /well	$1 \cdot 10^4$ /well
HNSC.100, HNSC.LatGFP1.2, TH4-7-5, U-251MG, U-87MG, Jurkat	$4 \cdot 10^5$ /well	$2 \cdot 10^5$ /well	$1 \cdot 10^5$ /well	$5 \cdot 10^4$ /well	$2 \cdot 10^4$ /well

2.2.3 Kultivierung, Aussaat und Differenzierung von HNSC.100 und HNSC.LatGFP1.2

Die Oberflächen sämtlicher Kulturgefäße für HNSC.100 oder HNSC.LatGFP1.2 Zellen wurden zuerst mit Poly-L-Lysin Lösung behandelt. Dafür wurden die Oberflächen mit Poly-L-Lysin Lösung benetzt und 20 min bei RT inkubiert. Nach Abnahme des Poly-L-Lysin wurden die Oberflächen zweimal mit 1x PBS gewaschen und anschließend bei RT getrocknet. Bei der Passage von HNSC.100 und HNSC.LatGFP1.2 Zellen wurde das Proliferationsmedium abgenommen, die Zellen mit 5 ml 1x PBS gewaschen, 1 ml 0,5% Trypsin hinzugegeben und die Zellen bei 37 °C für 3 min inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit 9 ml 1x PBS + 10% FKS abgespült und in ein 15 ml Reaktionsgefäß übertragen. Nach einer Zentrifugation bei 200 g für 5 min, wurde der Überstand verworfen und die Zellen in frischem vorgewärmten Proliferationsmedium resuspendiert. Ein geeignetes Aliquot wurde in eine frische T75 Zellkulturflasche übertragen. Die Aussaat der Zellen erfolgte wie im Abschnitt 2.2.2 beschrieben.

Um HNSC.100/HNSC.LatGFP1.2 Zellen zu differenzieren wurde die 3-fache Menge an Zellen ausgesät (Tabelle 10). Am darauffolgenden Tag wurde die Dichte der Zellen überprüft. Bei vollständiger Konfluenz wurde das Proliferationsmedium abgenommen, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und es wurde frisches vorgewärmtes Differenzierungsmedium auf die Zellen gegeben. Das Differenzierungsmedium wurde zweimal die Woche gewechselt, nach zwei Wochen war die Differenzierung abgeschlossen.

2.2.4 Transfektion von Plasmiden mit X-tremeGENE (Roche)

Um Fremd-DNA in eukaryotischen Zellen zu exprimieren, ist es möglich mittels Transfektion Plasmide direkt in Zellen einzubringen. In dieser Arbeit wurden Transfektionen mit X-tremeGENE von Roche durchgeführt. X-tremeGENE ist ein nicht-liposomales Multikomplexreagenz, das DNA komplexiert und somit die Aufnahme durch Zellen ermöglicht.

Am Tag vor der Transfektion wurden Zellen ausgesät (Tabelle 10). Für die Transfektion wurden pro 1 µg DNA 200 µl FKS-freies DMEM Medium (Tabelle 3) vorgelegt, die DNA hinzugefügt und der Ansatz wurde kurz gevortext. Danach wurden pro Ansatz 3 µl XtremeGene zugefügt und der Ansatz wurde erneut kurz gevortext. Der Ansatz wurde für 10 min bei RT inkubiert und anschließend tropfenweise auf die Zellen pipettiert. Die transfizierten Zellen wurden für mindestens 48 h im Brutschrank inkubiert.

2.2.5 Transduktion von Zellen/Organoiden mit viralen Vektoren

Alternativ zur Transfektion ist es auch möglich Fremd-DNA mit Hilfe eines viralen Vektors in Zellen einzubringen. Als virale Vektoren wurden in dieser Arbeit AAVs verwendet, deren Titer nach der Produktion (2.2.6) mittels qPCR (2.3.14) ermittelt wurde. Der gewünschte

Zelltyp wurde am Vortag der Transduktion ausgesät (Tabelle 10). AAVs wurden bei 37 °C aufgetaut und mit einer MOI (= multiplicity of infection) von $1 \cdot 10^5$ direkt auf die Zellen gegeben. Nach Zugabe der Vektoren wurde die Zellkulturschale vorsichtig geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung der Vektoren im Medium zu garantieren. Die transduzierten Zellen wurden für mindestens 48 h im Brutschrank inkubiert.

Transduktionen von HNSC.100 Zellen während des AAV Screenings (3.1.1) wurden mit 10 µl von jeder Vektorstocklösung durchgeführt, da es sich bei der AAV Bibliothek um Zelllysate handelt und die einzelnen Titer nicht bestimmt wurden.

Organoide wurden mit $1,5 \cdot 10^{11}$ /ml AAV9P1 Partikeln transduziert und für 48 h Stunden kultiviert.

2.2.6 Produktion von Adeno-assoziierten Vektoren

Für die Produktion von AAVs wurden 10x 15 cm Petrischalen mit jeweils $4,5 \cdot 10^6$ HEK293T Zellen ausgesät. Zwei Tage nach der Aussaat wurden die Zellen mit 3 Plasmiden transfiziert: pHelper, pRep2CapX (X = gewünschtes Kapsidprotein; 2.1.5) und pSSV9-basiertes Plasmid für ssAAVs oder pBSU6-basiertes Plasmid für scAAVs (2.1.5). Für die Transfektion der Zellen einer Petrischale wurden 2 ml FKS-freies DMEM mit jeweils 7,5 µg von jedem Plasmid gemischt. Anschließend wurden 67,5 µl PEI (1 mg/ml) hinzugefügt und der komplette Ansatz wurde kurz gevortext. Nach Inkubation des Ansatzes bei RT für 10 min, wurde der Transfektionsmix tropfenweise auf der Platte verteilt, die Platte wurde vorsichtig geschwenkt und die Zellen wurden für 6 h im Brutschrank inkubiert. Nach 6 h wurde das Medium abgenommen und durch frisches DMEM ersetzt. Im Anschluss wurden die Zellen für 72 h im Brutschrank inkubiert.

Da AAVs nicht in den Zellkulturüberstand abgegeben werden, wurden die Zellen mittels eines Zellschabers von der Platte geerntet. Hierfür wurden die Zellen ins Medium geschabt und anschließend in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Platte wurde zusätzlich mit 10 ml 1x PBS gespült, um alle restlichen Zellen zu ernten. Die Zellsuspensionen aller Platten einer Virusproduktion wurden bei 200 g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde mit 25 ml 1x PBS gewaschen. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet in 4 ml AAV-Lyse Puffer (6.1) resuspendiert. An diesem Punkt war es möglich die AAV Produktion zu unterbrechen und die Zellen bei -80 °C einzufrieren.

Die Zellen wurden durch fünf Einfrier-Auftau Zyklen aufgeschlossen. Während eines Zyklus wurden die Zellen für 3 min in flüssigem Stickstoff eingefroren, danach im Wasserbad (37 °C) aufgetaut und kurz gevortext. Anschließend wurde die Zellsuspension für 90 s im Ultraschallbad weiter aufgeschlossen. Pro Ansatz wurden 50 U/ml Benzonase hinzugefügt, der Ansatz wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert, um Nukleinsäuren außerhalb von AAV

Kapsiden abzubauen. Das Zelllysate wurde als nächstes bei 900 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand wurde in ein frisches 50 ml Reaktionsgefäß übertragen und die Zentrifugation wurde wiederholt. Der vom Zelldebris aufgereinigte Virusstock wurde entweder sofort aliquotiert und bei -80 °C eingefroren oder mittels eines Iodixanol-Gradienten weiter aufgereinigt.

Der Iodixanol-Gradient wurde in ein 8,9 ml Polyallamer OptiSeal Zentrifugenröhrchen pipettiert (Abbildung 11).

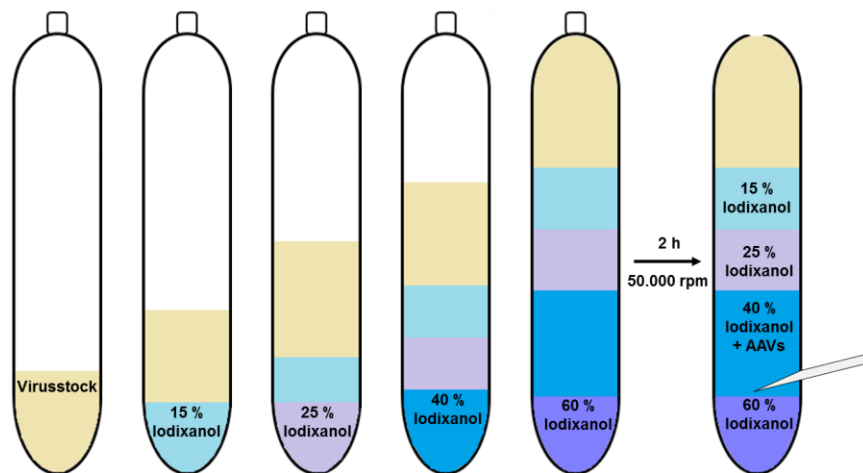


Abbildung 11: Pipettierschema eines Iodixanolgradienten. Der Gradient wurde in 8,9 ml Polyallamer OptiSeal Zentrifugenröhrchen pipettiert. Als erstes wurde der Virusstock hinzugefügt, bevor die einzelnen Phasen unter die jeweils vorangegangene Phase pipettiert wurden. Nach einer Zentrifugation bei 320.000 g für 2 h wurde die 40% Iodixanolphase, in der sich die AAVs anreichern, mit Hilfe einer Kanüle abgenommen.

Hierfür wurde zuerst der Virusstock vorsichtig und unter Vermeidung von Blasenbildung in das Röhrchen pipettiert. Im Anschluss wurden vier Iodixanol Phasen von unterschiedlicher Konzentration hinzugefügt, wobei die jeweils höher konzentrierte Phase unter die vorherige pipettiert wurde, um somit klare Phasengrenzen zu erzeugen (Abbildung 11). Folgende Mengen der unterschiedlichen Iodixanol-Verdünnungen wurden verwendet: 0,75 ml 15% Iodixanol-Lösung, 1,0 ml 25% Iodixanol-Lösung, 1,5 ml 40% Iodixanol-Lösung, 1,0 ml 60% Iodixanol-Lösung. Die genaue Zusammensetzung der Iodixanol-Lösungen ist in Abschnitt 6.1 aufgelistet. Das Röhrchen wurde verschlossen, mit einem passenden Gegengewicht auf 0,01 g genau austariert und anschließend folgte eine Zentrifugation bei 320.000 g und 4 °C für 2 h. Während der Zentrifugation reichern sich die AAV Partikel in der 40% Iodixanol-Lösung an. Nach der Zentrifugation wurde der Deckel des Röhrchens abgenommen und mit Hilfe einer Kanüle (Ø 0,6x25 mm) die Wand des Röhrchens am unteren Ende der 40%

Phase durchstoßen (Abbildung 11). Die AAV-haltige 40% Phase wurde abgenommen, aliquotiert und bei -80 °C weggefroren.

Der Titer jeder AAV Produktion wurde mittels qPCR (2.3.14) bestimmt.

2.2.7 gRNA Screening

Wie in der Einleitung (1.3) beschrieben, besteht das CRISPR/Cas9 System aus der Nuklease Cas9 und einer sogenannten gRNA (= guide RNA). Sechs verschiedene gRNAs zur Bindung an das provirale Genom (Abbildung 32) und eine Kontroll-gRNA zur Bindung an *Renilla Luciferase* wurden wie im Abschnitt 3.4.2.1 beschrieben entworfen und in verschiedene Plasmide kloniert (Tabelle 7). Zur Identifizierung potenter gRNA-Plasmid Kombinationen, die in der Lage sind die HIV-1 Replikation zu inhibieren, wurde ein Screeningablauf wie in Abbildung 12 dargestellt, etabliert.

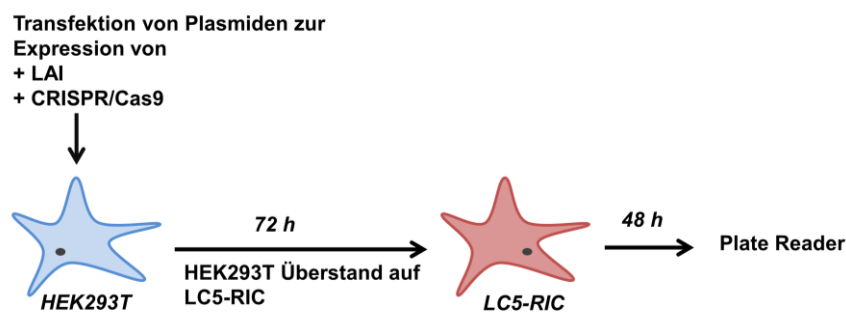


Abbildung 12: Schema zum Ablauf des gRNA Screenings. An Tag eins wurden HEK293T Zellen mit pLAI.2 und verschiedenen Plasmiden, die für unterschiedliche CRISPR/Cas9 Kombinationen kodieren, ko-transfiziert. Nach 72 h wurden 20 µl des HEK293T Überstandes, in dem sich HIV-1 Partikel befanden, auf die Reporterzelllinie LC5-RIC pipettiert. LC5-RIC Zellen enthalten einen durch die HIV-1 Proteine Tat und Rev induzierbaren dsRed Reporter. Weitere 48 h später wurden die LC5-RIC Zellen auf die Expression des dsRed Reporters durch Messung der Fluoreszenzintensität mit Hilfe eines Plate Readers untersucht.

HEK293T Zellen wurden in 48-well Platten ausgesät (Tabelle 10). Am nächsten Tag wurden die Zellen mit verschiedenen Plasmidkombinationen transfiziert (2.2.4). Ein Transfektionsansatz enthielt 100 ng pLAI.2, 200 ng CRISPR/Cas9 Plasmid (2.1.5) und 0,6 µl XtremeGENE in 50 µl FKS-freiem DMEM. Die Expression von pLAI.2 in HEK293T Zellen führt zur Bildung und Freisetzung infektiöser HIV-1 Partikel, während die Expression verschiedener CRISPR/Cas9 Konstrukte die HIV-1 Expression inhibiert. Als Negativkontrollen wurden HEK293T Zellen mit dem leeren pUC18 Plasmid transfiziert (= mock) oder mit pUC18 und entweder pSSV9_shortCMV-Cas9 (=mock+Cas9),

pU6gRNA5_RSVgfp (=mock+gRNA) oder pSSV9_shortCMV_Cas9_U6g5 (=mock+all-in-one). Als Positivkontrollen wurden HEK293T Zellen mit pLAI.2 alleine transfiziert (=LAI) oder mit pLAI.2 und entweder pSSV9_shortCMV-Cas9 (=LAI+Cas9), pU6gRNA5_RSVgfp (=LAI+gRNA) oder pSSV9_shortCMV_Cas9_7SKLuc (=LAI+Luc).

72 h Stunden nach Transfektion wurden 20 µl des HEK293T Überstandes zu LC5-RIC Zellen gegeben, welche 24 h zuvor in eine 96-well Platte ausgesät worden waren. Das Fluoreszenzsignal der LC5-RIC Zellen wurde 48 h nach Übertrag der Überstände im Tecan Infinite M200 Plattenleser analysiert. Hierfür wurde das Kulturmedium restlos abgenommen und die Expression des dsRed Reporters bei einer Anregung von 552 nm und einer Emission von 596 nm gemessen.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Microsoft Excel. Der Mittelwert (MW) der Positivkontrolle (= nur Virus, ohne CRISPR/Cas9) wird hierbei als 100% Infektion und der Mittelwert der Negativkontrolle (= ohne Virus, ohne CRISPR/Cas9) als 0% Infektion gewertet (Formel 1).

$$\text{Infektion [\%]} = \frac{\text{Messwert } X - \text{MW Negativkontrolle}}{\text{MW Positivkontrolle}} * 100$$

Formel 1: Der Prozentsatz an infizierten Zellen (Infektion [%]) errechnet sich aus der Differenz des Messwertes X und dem Mittelwert (MW) der Negativkontrollen (= uninfizierte und unbehandelte Zellen). Diese Differenz wird im Anschluss durch den Mittelwert (MW) der Positivkontrolle (= infizierte und unbehandelte Zellen) geteilt. Das Ergebnis wird durch die Multiplikation mit 100 in Prozent umgerechnet.

Einzelne Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt. Nach drei unabhängigen Experimenten wurden die Ergebnisse gemittelt und die Standardabweichungen bestimmt.

2.2.8 Quantifizierung von Gag-p24 Mengen

Um die Menge an HIV-1 Kapsidprotein in Zellkulturüberständen zu bestimmen, wurde der HIV-1 p24 Antigen Capture Assay von Advanced Bioscience Laboratories verwendet. Dafür wurden Zellkulturüberstände abgenommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße übertragen. Die Überstände wurden bei 200 g für 3 min zentrifugiert, um darin befindliche Zellen zu entfernen. Als nächstes wurden die Überstände in DMEM + 0,5% Triton-X verdünnt, um die Lipidmembran der Viruspartikel zu lysieren und p24 freizusetzen. Die Verdünnungen erfolgten abhängig von der erwarteten p24 Menge und befanden sich im Bereich von 1:10 bis 1:10.000. Ein Standard, bestehend aus rekombinanten p24 Protein, wurde in den Konzentrationen 100 pg/ml, 50 pg/ml, 25 pg/ml, 12,5 pg/ml, 6,25 pg/ml und 3,1 pg/ml

angefertigt. Für die Verdünnungen des Standards wurde DMEM + 0,5% Triton-X verwendet. Jeweils 100 µl der verdünnten Zellkulturüberstände und der Standardlösungen wurden in eine ELISA Platte überführt, welche zuvor mit 25 µl Lyse-Puffer pro Vertiefung versehen wurde. Die Platte wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Platte wurde dreimal mit dem Waschpuffer des Kits gewaschen. Pro Vertiefung wurden 100 µl der Konjugat-Lösung hinzugefügt und die Platte wurde erneut bei 37 °C für 1 h inkubiert. Als nächstes wurde die Platte dreimal gewaschen, bevor 100 µl der Peroxidase-Lösung hinzugefügt wurden. Die Platte wurde für 30 min bei RT im Dunklen inkubiert und die Peroxidase Reaktion wurde schließlich mit 100 µl Stopp-Lösung abgebrochen. Die Platte wurde im Plattenleser ausgewertet, wobei eine Absorption bei 450 nm gemessen wurde. Mit Hilfe der Standardverdünnungen konnte im Anschluss eine Standardkurve erstellt werden und somit die p24 Mengen der Proben bestimmt werden.

Neben Zellkulturüberständen wurden auch Zelllysate für den p24 ELISA verwendet, um die intrazelluläre Menge an p24 zu bestimmen. Hierfür wurden die Zellen wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben geerntet. Anschließend wurden die Zellen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 200 g für 3 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet mit 1x PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde im Anschluss in 200 µl DMEM + 5% Triton-X resuspendiert und zur Lyse für 15 min bei RT inkubiert. Als nächstes wurde das Zelllysate bei 900 g für 5 min zentrifugiert, um vorhandenen Zelldebris zu entfernen. Der Überstand wurde im Verhältnis 1:10.000 mit DMEM verdünnt und wie bereits beschrieben für einen p24 ELISA verwendet.

2.2.9 Immunfluoreszenzfärbung von humanen Zellen

Zellen, die für eine Immunfluoreszenzfärbung vorgesehen waren, wurden auf 12 mm Deckgläschen ausgesät. Dafür wurde je ein Deckgläschen in eine Vertiefung einer 12-well Platte gelegt. Die Deckgläschen wurden zur Sterilisation in 80% EtOH getränkt, anschließend mit 1x PBS gewaschen und bei RT getrocknet. Für Färbungen von HNSC.100 Zellen wurden die Deckgläschen im Anschluss zur Desinfektion mit Poly-L-Lysine behandelt (2.2.3). Nach der Aussaat der Zellen wurden diese entsprechend dem gewünschten Experiment behandelt. Nach Abschluss der Behandlung wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen wurden mit 1x PBS gewaschen. Durch Zugabe von 500 µl 1x PBS + 2% PFA wurden die Zellen fixiert. Die Fixierung wurde über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Am nächsten Tag wurde die Fixierlösung abgenommen und die Zellen wurden viermal mit 1x PBS gewaschen. 500 µl Quenching-Lösung (6.1) wurden pro Vertiefung auf die Zellen gegeben und die Zellen wurden für 10 min bei RT inkubiert. Nach vier Waschschritten mit 1x PBS wurden die Zellen durch Zugabe von 500 µl 1x PBS + 0,1%

Triton-X für 10 min bei RT permeabilisiert. Dieser Schritt dient zur Destabilisierung der zellulären Membranen, um den Eintritt von Antikörpern zu ermöglichen. Im Anschluss wurden die Zellen viermal mit 1x PBS gewaschen und als nächstes geblockt. Hierfür wurden die Zellen für 10 min bei RT mit 500 µl 1x PBS + 5% BSA behandelt. Die Primärantikörper wurden entsprechend Tabelle 8 in 1x PBS + 5% BSA verdünnt. 50 µl jeder Antikörperlösung wurden auf ein Stück Parafilm pipettiert und das Deckgläschen mit den Zellen wurde aus der 12-well Platte entnommen und mit der Zellseite auf der Antikörperlösung platziert. Die Deckgläschen wurden in einer feuchten Kammer 1 h für die Färbung von zytoplasmatischen Proteinen und 1,5 h für die Färbung von Proteinen im Zellkern inkubiert. Im Anschluss wurden die Deckgläschen zurück in die 12-well Platte übertragen und viermal mit 1x PBS gewaschen. Sekundärantikörper wurden entsprechend Tabelle 8 in 1x PBS + 5% BSA verdünnt. Erneut wurden 50 µl jeder Antikörperlösung auf ein Stück Parafilm pipettiert und die Zellplättchen darauf platziert. Die Inkubation mit den Sekundärantikörpern erfolgte für 1 h in einer feuchten Kammer bei RT und in Dunkelheit. Wieder wurden die Deckgläschen in eine 12-well Platte übertragen und viermal mit 1x PBS gewaschen. Zuletzt wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt. Dafür wurde DAPI-Stocklösung (1 mg/ml) 1:1000 in 1x PBS verdünnt. Es wurden 300 µl der DAPI-Lösung auf die Zellen gegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Die DAPI-Lösung wurde abgenommen und die Zellen wurden viermal mit 1x PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden mit Molwol überzogen und mit der Zellseite nach unten auf Objektträger gelegt. Die Objektträger wurden über Nacht bei RT und in Dunkelheit getrocknet und anschließend bei 4 °C gelagert.

Zellen die sich von humanen induziert pluripotenten Stammzellen (hiPSC) ableiten, wurden direkt in ihren Kulturschalen gefärbt. Hierfür wurden alle Schritte bis zur Inkubation mit Primärantikörpern (Tabelle 8) wie oben beschrieben durchgeführt. 300 µl der Primärantikörper-Lösungen wurden direkt auf die Zellen gegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Nach vier Waschschritten mit 1x PBS wurden 300 µl der Sekundärantikörper-Lösungen (Tabelle 8) direkt auf die Zellen gegeben und ebenfalls für 1 h bei RT und in Dunkelheit inkubiert. DAPI Färbung der Zellkerne wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Nach den Färbungen wurden die Zellen mit 500 µl 1x PBS versehen und unmittelbar in Anschluss mikroskopiert.

2.2.10 Immunfluoreszenzfärbung von Organoiden

AAV-transduzierte Organoide (2.2.5) wurden mit einer abgeschnittenen 1 ml Pipettenspitze vom Kulturmedium in 1x PBS übertragen und anschließend in 1x PBS + 4% PFA fixiert. Das Einbetten der Organoide in Gelatine/Sucrose Lösung und das anschließende Anfertigen von Kryo-Schnitten (Dicke pro Schnitt = 12 µm) wurde von Marion Lechner (Institut für Entwicklungsgenetik, Helmholtz Zentrum München) durchgeführt. Die Schnitte wurden auf

Objektträgern platziert und bei -20 °C gelagert.

Für die Immunfluoreszenzfärbung der Schnitte wurden die Objektträger für 15 min bei RT aufgetaut und anschließend für 1 h bei RT mit Permeabilisierungspuffer (6.1) behandelt. Antikörper gegen GFAP und beta III Tubulin wurden entsprechend Tabelle 8 in 1x PBS + 1% BSA + 0,2% Triton-X verdünnt und anschließend entweder getrennt oder im Verhältnis 1:1 gemischt. Der Objektträger wurde über Nacht bei 4 °C in einer feuchten, dunklen Kammer mit der Antikörpermischung inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde der Objektträger dreimal mit 1x PBS gewaschen und mit den Sekundärantikörpern inkubiert. Diese wurden wie in Tabelle 8 beschrieben in 1x PBS + 1% BSA + 0,2% Triton-X verdünnt und anschließend entweder getrennt oder als 1:1 Mischung auf den Objektträger gegeben. Inkubation mit den Sekundärantikörpern erfolgte für 1 h bei RT in einer feuchten Kammer. Als nächstes wurden die Objektträger dreimal mit 1x PBS gewaschen und mit DAPI gefärbt (2.2.9). Nach drei weiteren Waschschritten mit 1x PBS wurden die Schnitte auf den Objektträgern mit Molviol überzogen und mit Deckgläschen bedeckt. Am nächsten Tag wurden die Objektträger mikroskopiert.

2.2.11 Mikroskopie-Analyse

Sämtliche Mikroskopiebilder/-analysen wurden mit einem Nikon TiE, welches mit dem Perkin Elmer UltraView Vox System ausgestattet wurde, durchgeführt. Als Software wurde Volocity 6.2.1 von Perkin Elmer verwendet. Immunfluoreszenzfärbung wurden wie in den Abschnitten 2.2.9 und 2.2.10 beschrieben durchgeführt. Für die Quantifizierung von Ki-67 positiven proliferierenden und differenzierten HNSC.100 Zellen wurden jeweils 300 Zellen ausgezählt. Für die Quantifizierung der Ko-Lokalisation von EYFP mit Nestin (= proliferierende HNSC.100) oder GFAP (= differenzierte HNSC.100) wurden jeweils 200 Zellen gezählt. Die Ko-Lokalisation von EYFP mit GFAP (= Astrozyten) oder beta III Tubulin (= Neuronen) innerhalb von Organoiden wurde mittels des Pearson Korrelationskoeffizienten (PI) bestimmt. Hierbei werden mit Hilfe der Software Volocity 6.2.1 unterschiedliche Proteinfärbungen des gleichen Bildausschnittes übereinandergelegt. Die Software errechnet im Anschluss zu welchem Maß die Pixel der einzelnen Proteinfärbungen ko-lokalisieren und gibt diese Ko-Lokalisation als Wert zwischen 0 (= keine Übereinstimmung) und 1 (= völlige Übereinstimmung der Pixel) an.

2.2.12 FACS Canto II Analyse und Auswertung

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (*engl.* FACS = fluorescence-activated cell sorting) ist es möglich Zellen auf die Expression von Fluoreszenzproteinen zu untersuchen, hierfür werden die Zellen einzeln in eine Kapillare gesaugt. Die so vereinzelt Zellen werden zum einen durch Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) auf Größe und Granulität untersucht,

somit ist es möglich eine intakte Zellpopulation zu definieren, zum anderen werden die Zellen mittels Anregung durch einen Laserstrahl auf die Expression von Fluoreszenzproteinen geprüft.

Um Zellen mit Hilfe des FACS Canto II auf die Expression von Fluoreszenzproteinen zu untersuchen, wurden die Zellen wie in den Abschnitten 2.2.2 und 2.2.3 geerntet. Die Zellen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen und bei 200 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in 500 µl 1x PBS gewaschen. Als nächstes wurde die Zentrifugation wiederholt und das Pellet wurde in 400 µl 1x PBS + 2% PFA resuspendiert. Die Zellen wurden entweder bei RT für 15 min oder über Nacht bei 4 °C fixiert. Die fixierten Zellen wurden im Anschluss in ein FACS-Röhrchen übertragen und am FACS Canto II analysiert. Eine Negativkontrolle (= ohne Fluoreszenzprotein) wurde benutzt um mit Hilfe des Vorwärts- und des Seitwärtsstreulichts eine Region (= Gate) mit intakten Zellen zu definieren und gleichzeitig um die Grenze zu einem Gate zu bestimmen, welches die Unterscheidung von fluoreszierenden Zellen von nicht fluoreszierenden Zellen ermöglicht. Im Anschluss wurden verschiedene Proben analysiert, wobei pro Probe 10000 Events detektiert wurden. Sämtliche FACS Daten in dieser Arbeit werden als Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt, wobei jedes Experiment in Triplikaten durchgeführt wurde. Es werden jeweils die Mittelwerte aller Wiederholungen zusammen mit der Standardabweichung dargestellt.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion ermöglicht es bestimmte DNA Sequenzen aus einem Plasmid oder aus genomischer DNA (gDNA) zu amplifizieren. Sämtliche PCR Ansätze, die im Anschluss zur Klonierung oder Sequenzierung verwendet wurden, wurden mit einer Polymerase durchgeführt, welche eine zusätzliche 3' – 5' Exonuklease-Aktivität (= proof-reading Aktivität) besitzt. Mit Hilfe dieser Exonuklease-Aktivität kann die Polymerase falsch eingebaute Nukleotide entfernen und verringert so die Wahrscheinlichkeit eines Sequenzfehlers. Ein Standardansatz für eine solche PCR ist in Tabelle 11 gezeigt, während Tabelle 12 den Ablauf einer solchen PCR zeigt.

Tabelle 11: Reaktionsansatz für eine Standard-PCR mit der proof-reading Polymerase Pfu. Primersequenzen sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Substanz	Menge
10x Pfu Puffer mit 20 mM MgCl ₂	5 µl

dNTP Mix (jeweils 10 μ M)	2 μ l (jeweils 0,1 μ M)
Primer 1 (10 μ M)	200 nM für Plasmid Amplifikation 400 nM für Amplifikation aus gDNA
Primer 2 (10 μ M)	200 nM für Plasmid Amplifikation 400 nM für Amplifikation aus gDNA
DNA	100 ng Plasmid-DNA 300 ng gDNA
Pfu Polymerase	2,5 Units
Nuklease-freies Wasser	variabel
Totales Volumen	50 μ l

Tabelle 12: Reaktionsablauf einer PCR (Pfu oder Taq). Die Temperatur während der Hybridisierung ist von der Primersequenz (Tabelle 5) abhängig und beträgt fünf Grad weniger als die Schmelztemperatur T_m des Primers.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95 °C	3 min	1
Denaturierung	95 °C	30 s	35
Hybridisierung	variabel	30 s	
Elongation	72 °C	2 min/kb für Pfu Polymerase 1 min/kb für Taq Polymerase	
Elongation	72 °C	10 min	1

Alle PCR Ansätze, bei denen keine 3' - 5' Exonuklease-Aktivität benötigt wurde, wurden mit einer Taq Polymerase durchgeführt. Tabelle 13 zeigt einen Standardansatz einer solchen PCR, während Tabelle 12 den Reaktionsablauf darstellt.

Tabelle 13: Reaktionsansatz für eine Standard-PCR mit der Taq Polymerase. Primersequenzen sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Substanz	Menge
5x Green GoTaq Reaktionspuffer	10 μ l
dNTP Mix (jeweils 10 μ M)	2 μ l (jeweils 0,1 μ M)
Primer 1 (10 μ M)	400 nM
Primer 2 (10 μ M)	400 nM
Genomische DNA	300 ng
Taq Polymerase	1,25 Units

Nuklease-freies Wasser	variabel
Totales Volumen	50 µl

PCR Produkte wurden im Anschluss bei -20 °C gelagert. Eine Aufreinigung der Amplifikate erfolgte entweder über Agarosegel-Elektrophorese (2.3.3) oder direkt mit Hilfe des NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kits von Macherey-Nagel (2.3.4).

2.3.2 Restriktionsverdau

Für Klonierungen wurde sowohl das Ziel-Plasmid als auch das geplante Insert (= aufgereinigtes PCR-Produkt) mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut, um die für die Ligation (2.3.5) benötigten identischen Überhänge zu erzeugen. In Tabelle 14 ist ein Standardansatz für einen Restriktionsverdau aufgeführt. Alle Ansätze wurden für mindesten 1 Stunde bei der für das jeweilige Enzym empfohlenen Temperatur inkubiert. Im Anschluss an den Verdau wurden Plasmide über eine Agarosegel-Elektrophorese (2.3.3) und PCR Produkte direkt mit Hilfe des NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kits von Macherey-Nagel aufgereinigt (2.3.4).

Tabelle 14: Reaktionsansatz für einen Restriktionsverdau.

Substanz	Menge
10x NEB Puffer	3 µl
Enzym 1	10 Units
Enzym 2	10 Units
Plasmid	5 µg
Nuklease-freies Wasser	variabel
Totales Volumen	30 µl

Substanz	Menge
10x NEB Puffer	5 µl
Enzym 1	10 Units
Enzym 2	10 Units
Aufgereinigtes PCR Produkt	40 µl
Nuklease-freies Wasser	variabel
Totales Volumen	50 µl

Der Erfolg einer Klonierung wurde ebenfalls durch einen Restriktionsverdau überprüft. Dafür wurden 500 ng DNA Präparation (2.3.7), 2 µl 10x NEB Puffer und jeweils 2,5 Units Enzym in einem Gesamtvolumen von 20 µl angesetzt. Der Ansatz wurde für 2 Stunden bei einer für das jeweilige Enzym empfohlenen Temperatur inkubiert. Der Restriktionsverdau wurde im Anschluss mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.3.3) überprüft.

2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA Proben mittels einer Gelelektrophorese aufzutrennen, wurden 1 %ige Agarosegele gegossen. Hierfür wurden 100 ml 1x TAE Puffer (6.1) mit 1 g Agarose gemischt und in der Mikrowelle erhitzt bis die Agarose vollständig aufgelöst war. Die Lösung wurde mit 7 µl

Ethidiumbromid-haltiger Lösung (10 mg/ml) versetzt und in eine Gelkammer mit Kämmen gegossen. Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurde es in eine Laufkammer, welche mit 1x TAE Puffer gefüllt, war gelegt.

Alle Proben wurden mit 5x Green GoTaq Reaktionspuffer (Promega) versetzt und in die Taschen des Agarosegels geladen. Um die Größe der DNA Banden zu bestimmen wurde der 2log DNA Größenstandard verwendet. Das Agarosegel wurde für 30 – 45 min einer Spannung von 100 V ausgesetzt und anschließend mittels UV Licht ausgewertet. Während Klonierungen wurden die Agarosegele einer UV-Wellenlänge von 365 nm ausgesetzt, somit konnten die benötigten Banden ohne Schäden an der DNA-Sequenz ausgeschnitten und aufgereinigt werden. Die Dokumentation aller anderen Gele wurde bei einer Wellenlänge von 302 nm durchgeführt.

2.3.4 Aufreinigung von DNA mittels NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit

Für Klonierungen wurden sowohl das Ziel-Plasmid als auch das Insert mit Restriktionsenzymen verdaut (2.3.2), die Verdauprodukte wurden über ein Agarosegel aufgetrennt (2.3.3) und die gewünschten Banden wurden mit Hilfe des NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit aufgereinigt. Die Elution wurde mit 40 µl MilliQ Wasser durchgeführt. PCR Produkte wurden ohne vorheriges Auftrennen durch ein Agarosegel aufgereinigt. Die Elution erfolgte hierbei mit 30 µl MilliQ Wasser.

2.3.5 Ligation

Für Klonierungen wurden sowohl das Ziel-Plasmid als auch das Insert verdaut (2.3.2), aufgereinigt (2.3.4) und es wurden die DNA Mengen photometrisch bestimmt (2.3.8). Ein Standardansatz für eine Ligation ist in Tabelle 15 aufgeführt. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert.

Tabelle 15: Reaktionsansatz für eine Ligation. Standardmäßig wurden 100 ng Ziel-Plasmid und davon die fünffache Menge an Insert verwendet.

Substanz	Menge
10x T4 DNA Ligasepuffer	2 µl
T4 DNA Ligase	5 Units
Ziel-Plasmid	100 ng
Insert	5-fache molekulare Menge an Ziel-Plasmid
Nuklease-freies Wasser	variabel
Totales Volumen	20 µl

Um die korrekte Menge an Insert DNA zu bestimmen wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Insert [ng]} = \frac{\text{Plasmid [ng]} * \text{Insert [bp]}}{\text{Plasmid [bp]}} * 5$$

Formel 2: Die Menge an Insert für eine Ligation errechnet sich aus dem Produkt der verwendeten Plasmidmenge (= 100 ng) und der Größe des Inserts in Basenpaaren (bp). Das Produkt wird im Anschluss durch die Größe des Plasmids geteilt, wodurch man die Menge an Insert erhält die für ein 1:1 Verhältnis von Plasmid und Insert benötigt wird. Um die fünffache Menge an Insert zu errechnen, wurde das Ergebnis mit 5 multipliziert.

2.3.6 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation von Plasmiden wurden chemisch kompetente *E. coli* verwendet (2.1.6). Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und sofort mit 10 µl Ligationsansatz oder 250 ng Plasmid versetzt. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis gestellt und alle 10 min vorsichtig gemischt. Anschließend wurden die Bakterien einem Hitzeschock (42 °C für 45 s) unterzogen und wieder für 2 min auf Eis gestellt. Danach wurden die Ansätze in 400 µl SOC Medium (2.1.1) aufgenommen und bei 37 °C für eine Stunde geschüttelt. 200 µl eines Transformationsansatzes wurden auf eine LB-Agar Platte mit passender Selektion plattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.3.7 Isolierung von Plasmid DNA

Nach der Transformation von *E. coli* (2.3.6) wurden einzelne Kolonien von den LB-Agar Platten gepickt und in 4 ml LB Medium mit passender Selektion über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 2 ml der Bakteriensuspension bei 900 g für 2 min zentrifugiert und das Bakterienpellet wurde mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit von Machery-Nagel aufgereinigt. Die Elution erfolgte in 30 µl MilliQ Wasser. Die aufgereinigte Plasmid DNA wurde mittels Restriktionsverdau (2.3.2) überprüft und bei erfolgreicher Klonierung wurden die verbleibenden 2 ml der Bakteriensuspension in 200 ml frischem LB Medium mit passender Selektion über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zusätzlich wurde die Klonierung durch Sanger-Sequenzierung der Plasmid DNA überprüft (2.3.9).

Durch das Ansetzen einer 200 ml Bakteriensuspension wird die Ausbeute an Plasmid DNA erhöht. Die Bakteriensuspension wurde für 20 min bei 900 g zentrifugiert und anschließend wurde mit dem NucleoBond PC 500 Kit von Macherey-Nagel die Plasmid DNA aufgereinigt. Das gefällte DNA Pellet wurde in 400 µl MilliQ Wasser resuspendiert.

2.3.8 Photometrische DNA/RNA Quantifizierung

Mit Hilfe des nanoDrop 2000c kann die Menge an DNA/RNA in einer Lösung bestimmt werden. Hierfür wird die Absorbanz der Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Eine zusätzliche Messung der Absorbanz bei 280 nm erlaubt eine Bestimmung der Reinheit der Probe, da bei dieser Wellenlänge aromatische Aminosäuren, die eine Verunreinigung durch Proteine bedeuten wurden, detektiert werden. Bei DNA Messungen entspricht ein Absorbanzwert von 1 gleich 50 µg/µl DNA, während bei RNA Messungen ein Absorbanzwert von 1 gleich 40 µg/µl RNA entspricht. Mit diesen Werten berechnet die Nanodrop Software die Konzentration der Lösung.

Ein weiteres Gerät zur Bestimmung der DNA Konzentration ist das Fluorometer Qubit von Invitrogen. Bei diesem Gerät wird die zu messende DNA Lösung mit einem Fluoreszenzfarbstoff gemischt, welcher sich spezifisch an DNA Moleküle anlagert und im Anschluss gemessen werden kann. Mit Hilfe einer Standardreihe an DNA Lösungen mit bekannten Konzentrationen ist es möglich die DNA Menge der Probe genau zu bestimmen. Laut Herstellerangaben ist diese Methode sensitiver und genauer als Absorbanzmessungen bei 260 nm. Die Quantifizierung der MiSeq Library wurde deswegen mit dem Qubit durchgeführt.

2.3.9 Sanger Sequenzierung

Um zu überprüfen, ob eine Klonierung erfolgreich war, wurde Plasmid DNA aus *E. coli* Kulturen isoliert (2.3.7) und mit einem Restriktionsverdau untersucht (2.3.2). Positive Klone wurden im Anschluss zu Eurofins MWG für eine Sequenzierung nach Sanger geschickt [160]. Dafür wurden 15 µl Plasmid DNA (100 ng/µl) zusammen mit 2 µl eines passenden Primers (1 µM) gemischt und eingeschickt. War kein passender Primer vorhanden, wurde die Plasmid DNA alleine geschickt und ein Standardprimer von MWG wurde ausgewählt. Die Sequenzierergebnisse wurden mit der BLAST Software von NCBI untersucht (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.3.10 T7 Assay

Die Expression von CRISPR/Cas9 in Zellen führt zur Bildung von Indel (= Insertion/Deletion) Mutationen in Genom der Zielzelle. Mit Hilfe eines T7 Assays ist es möglich diese Indel Mutationen nachzuweisen (Abbildung 13).

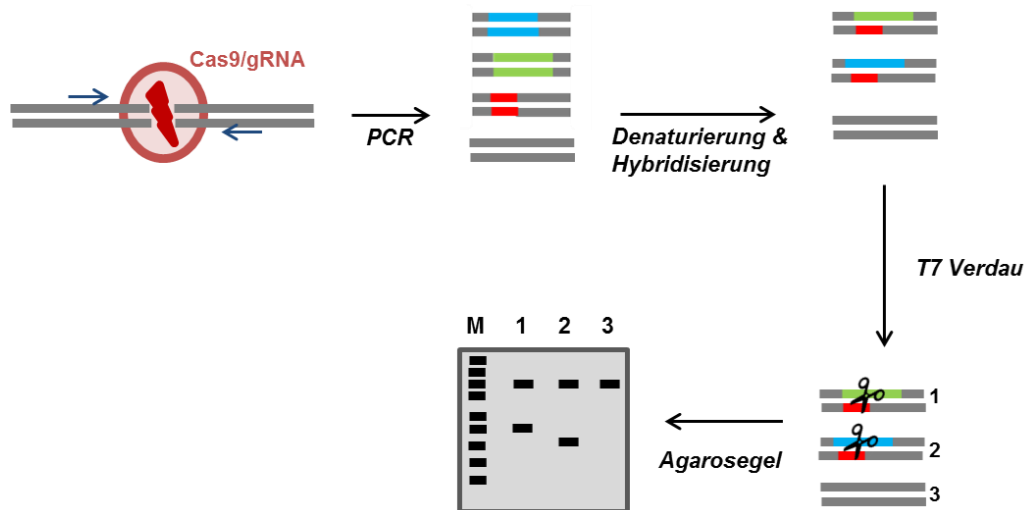


Abbildung 13: Schematischer Ablauf eines T7 Assays. Genomische DNA aus Zellen, die mit CRISPR/Cas9 behandelt wurden, wurde isoliert und im Anschluss als Ausgangsmaterial für eine PCR verwendet. Die PCR amplifiziert Bereiche, die eventuell Mutationen enthalten (blau, grün, rot). Als Negativkontrolle wurden Zellen verwendet, die einen HIV-1 Provirus beinhalten, aber nicht mit CRISPR/Cas9 behandelt wurden (grau). Nach einem Denaturierungs- und einem darauffolgenden Hybridisierungsschritt, wurden die Dimere mit der Endonuklease T7 geschnitten. T7 verdaut nur Heterodimere (1, 2), während Homodimere (3) nicht verdaut werden. Die Verdauungsprodukte wurden schließlich auf einem Agarosegel analysiert.

Dafür wurde die gDNA der Zellen wie in Abschnitt 2.3.11 beschrieben isoliert. Im Anschluss wurde der mutierte Bereich des HIV-1 LTRs mittels PCR mit einer proof-reading Polymerase amplifiziert (2.3.1). Als Primer wurden T7 fw und T7 rv (Tabelle 5) verwendet. Als Negativkontrolle wurden Zellen verwendet, die zwar einen HIV-1 Provirus beinhalten, aber nicht mit CRISPR/Cas9 behandelt wurden. Um den Erfolg der PCR zu überprüfen, wurde von jedem Ansatz ein Aliquot auf ein Agarosegel geladen (2.3.3). PCR Produkte wurden wie in Abschnitt 2.3.4 beschrieben aufgereinigt. Als nächstes wurden die PCR Produkte bei 95 °C denaturiert, um sich im Anschluss durch Abkühlen wieder zu doppelsträngigen PCR Produkten zusammenzulagern (Tabelle 16). Durch diesen Schritt entstehen vollständig komplementäre PCR Produkte (= Homodimere), aber auch Heterodimere, bestehend aus verschiedenen Indel Mutationen. Alle Ansätze wurden im Anschluss bei 37 °C für 10 min mit der Endonuklease T7 verdaut (Tabelle 17), bevor der Verdau durch Zugabe von 1,5 µl EDTA (0,25 M) gestoppt wurde. Die Endonuklease T7 kann hierbei nur Heterodimere schneiden, während Homodimere nicht verdaut werden. Somit erhält man bei Vorhandensein von Indel Mutationen Verdauungsprodukte, während bei Homodimeren lediglich die Bande für das unverdaute PCR Produkt zu sehen ist. Die Verdauungsprodukte wurden auf ein Agarosegel geladen (2.3.3) und auf das Vorhandensein von Verdauungsprodukten geprüft.

Tabelle 16: PCR Produkte wurden mit Hilfe eines PCR Geräts erst denaturiert und danach wurde durch langsames Abkühlen eine erneute Hybridisierung ermöglicht. Die Proben wurden bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Schritt	Temperatur	Temp.änderung/s	Zeit
Denaturierung	95 °C		5 min
Hybridisierung	95 – 85 °C	-2°C/s	
	85 – 25 °C	-0,1 °C/s	
Lagerung	4 °C		∞

Tabelle 17: Ansatz für einen Endonukleaseverdau.

Substanz	Menge
PCR Produkt	40 µl
10x NEB Puffer 2	5 µl
T7 Ligase	10 Units
MilliQ Wasser	4 µl
Totales Volumen	50 µl

2.3.11 Isolierung genomischer DNA (gDNA)

Um genomische DNA aus Zellen zu isolieren, wurden die Zellen nach der jeweiligen Behandlung aus den Kulturgefäßen geerntet (2.2.2, 2.2.3). Die Zellsuspensionen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße übertragen und bei 200 g für 3 min zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet wurde mit 500 µl 1x PBS gewaschen und die Zentrifugation wurde wiederholt. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Zellpellet wurde entweder bei – 80 °C eingefroren oder sofort in 200 µl 1x PBS resuspendiert. Die Isolation der gDNA erfolgte mit dem QIAamp DNA Mini Kit von Qiagen. Nach Zugabe von 20 µl ProteinaseK und 200 µl AL Lysepuffer, wurden die Proben für 10 min bei 56 °C inkubiert. Die Ansätze wurden im Anschluss mit 200 µl 100% EtOH versetzt und auf die Säulchen aus dem Kit geladen. Nach einer Zentrifugation bei 900 g für 1 min, wurde das Säulchen mit 500 µl AW1 Puffer gewaschen und erneut für 1 min bei 1200 g zentrifugiert. Das Säulchen wurde als Nächstes mit 500 µl AW2 gewaschen und diesmal bei 1200 g für 3 min zentrifugiert. Nachdem der Durchfluss entsorgt wurde, wurde das Säulchen erneut für 3 min bei 1200 g zentrifugiert. Das Säulchen wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäße übertragen und mit 40 µl MilliQ Wasser befüllt. Die Proben wurden zur Elution für 1 min bei RT inkubiert und für 3 min bei 1200 g zentrifugiert. Die isolierte gDNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.3.12 Isolierung zellulärer RNA

Um zelluläre RNA zu isolieren, wurden die Zellen nach der jeweiligen Behandlung aus den Kulturgefäßen geerntet (2.2.2, 2.2.3). Die Zellsuspensionen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße übertragen und bei 500 g für 3 min zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet wurde mit 500 µl 1x PBS gewaschen und die Zentrifugation wurde wiederholt. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Zellpellet wurde bei – 80 °C eingefroren. Die Isolation von zellulärer RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kit von Qiagen durchgeführt. Das Zellpellet wurde hierfür zuerst in 350 µl β -RLT Puffer (RLT Puffer + 1% β -Mercaptoethanol) resuspendiert. Die Lösung wurde auf ein QIAshredder Säulchen geladen und für 2 min bei 1500 g zentrifugiert. Das Filtrat wurde mit 350 µl 70% Ethanol versetzt und auf ein QIARNeasy Säulchen geladen. Nach einer Zentrifugation für 15 s bei 1500 g wurde das Filtrat entsorgt und das Säulchen wurde mit 350 µl RW1 Puffer versetzt. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde pro Säulchen 70 µl RDD Puffer + 25 Kunitz Units [161] RNase-freie DNase hinzugefügt, die Säulchen wurden für 15 min bei RT inkubiert, um sämtliche DNA aus den Proben zu entfernen. Nach Zugabe von 350 µl RW1 Puffer, wurden die Säulchen für 15 s bei 1500 g zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Säulchen zweimal mit jeweils 500 µl RPE gewaschen, dazwischen wurden die Säulchen jeweils für 2 min bei 1500 g zentrifugiert. Jedes Säulchen wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und wurden mit 30 µl Nuklease-freiem Wasser versetzt. Nach einer Inkubation für 2 min bei RT, wurden die Säulchen 1 min bei 1500 g zentrifugiert. Die RNA Lösungen wurden vermessen (2.3.8) und bei -80 °C gelagert.

2.3.13 Reverse Transkription

Um mRNA in cDNA (copy DNA) umzuschreiben wurde eine reverse Transkription durchgeführt. Hierfür wurde das SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) verwendet. Es wurde das Protokoll des Herstellers für cDNA mit Random Hexamer Primern verwendet. Jede Synthese wurde mit 1 µg RNA als Ausgangsmaterial und 100 ng/µl Random Hexamer Primern pro Reaktion durchgeführt. Die fertige cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.3.14 Quantitative PCR (qPCR)

Alle qPCRs wurden mit dem Roche LightCycler 480 II 96 durchgeführt, wobei das LightCycler® 480 SYBR Green I Master Kit verwendet wurde. Ein Standardreaktionsansatz ist in Tabelle 18 zu finden, während Tabelle 19 den Ablauf einer qPCR zeigt. Alle Experimente wurden mit der second derivate maximum Methode ausgewertet, welche den Cp Wert für jede Probe errechnet. Beim Cp Wert handelt es sich um den Zykluswert, bei dem die Amplifikation in die exponentielle Phase übergeht [162].

Tabelle 18: Reaktionsansatz für eine qPCR.

Substanz	Menge
2x LightCycler® 480 SYBR Green I Master	5 µl
Primer 1 (10 µM)	1 µl
Primer 2 (10 µM)	1 µl
DNA	1 – 3 µl
Nuklease-freies Wasser	variabel
Totales Volumen	10 µl

Tabelle 19: Reaktionsverlauf einer qPCR.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen	SYBR Green Messung
Denaturierung	95 °C	10 min	1	Nein
Denaturierung	95 °C	10 s	45	Nein
Hybridisierung	60 °C	10 s		Nein
Elongation	71 °C	10 s		Ja
Schmelzkurve	65 – 97 °C	+ 2,2 °C/s	1	Ja, durchgehend

Absolute Quantifizierung von AAV Genomen und EYFP Transgenen

Nach der Herstellung von AAV Vektoren (2.2.6) wurde der Titer mittels einer qPCR ermittelt. Hierfür wurden 10 µl des AAV Stocks mit 10 µl TE-Puffer (6.1) gemischt und anschließend mit 20 µl NaOH (2 M) versetzt. Um die Viren durch alkalische Lyse aufzutrennen, wurden die Proben für 30 min bei 56 °C inkubiert, bevor sie durch Zugabe von 38 µl HCl (1 M) neutralisiert wurden. Die Proben wurden auf 1 ml Gesamtvolumen mit MilliQ Wasser aufgefüllt. AAVs aus Zelllysaten wurden direkt für die qPCR eingesetzt, während AAVs, die zuvor durch einen Iodixanolgradienten aufgereinigt wurden, mit MilliQ Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnt wurden.

Um eine Quantifizierung zu ermöglichen wurden Verdünnungsreihen aus Plasmiden mit bekannter Konzentration angefertigt. Für die Quantifizierung von scAAVs wurde das Plasmid pBSU6 und für die Quantifizierung von ssAAVs wurde das Plasmid pSSV9 verdünnt (2.1.5). PCR Reaktionen wurden wie in Tabelle 18 beschrieben angesetzt und wie in Tabelle 19 beschrieben durchgeführt. Für die Quantifizierung von scAAVs wurden die Primer AAV-Titer fw und AAV-Titer rv, während für ssAAVs die Primer pSSV9 fw und pSSV9 rv verwendet wurden (2.1.3).

Für die Auswertung wurde aus den bekannten Konzentrationen der Standardreihe, die Anzahl der DNA Moleküle/µl berechnet (siehe Formel 3). Nach dem qPCR Lauf wurde

schließlich die Molekülanzahl gegen den passenden Cp-Wert aufgetragen, wodurch eine Standardkurve der Plasmidverdünnungsreihen entstand.

$$DNA \text{ Molekülzahl}/\mu\text{l} = \frac{\text{Plasmidkonzentration [g}/\mu\text{l}]}{\text{Molekulargewicht dsPlsmids [g/mol]}} * \text{Avogadro – Konstante [1/mol]}$$

Formel 3: Um die DNA Molekülzahl/ μl zu berechnen, wird der Quotient aus der Plasmidkonzentration und dem Molekulargewicht des Plasmids mit der Avogadro-Konstante multipliziert.

Mit Hilfe dieser Kurve war es im Anschluss möglich aus den Cp-Werten der zu testenden Proben die DNA Molekülzahl/ μl (= AAV-Genomzahl/ μl) und somit den Titer in GU/ml zu bestimmen.

Um die Anzahl an EYFP Transgenen zu bestimmen, wurden transduzierte Zellen geerntet (2.2.3), ausgezählt (2.2.2) und genomische DNA wurde isoliert (2.3.11). Als Primer wurden qPCR_YFP fw und qPCR_YFP rv (2.1.3) verwendet. Als Standardplasmid in bekannten Konzentrationen diente erneut pBSU6 (2.1.5), da dieses Plasmid für EYFP kodiert. Nachdem wie oben beschrieben, die komplette Anzahl an EYFP Transgenen innerhalb der Zellpopulation bestimmt wurde, wurde diese im Anschluss durch die Gesamtzahl an Zellen in der Zellpopulation geteilt. Somit wurden die EYFP Transgene pro Zelle bestimmt.

Relative Quantifizierung von Transkripten

Um die Expressionslevel von HIV Transkripten zu bestimmen, wurde zuerst RNA aus Zellen isoliert (2.3.12) und im Anschluss in cDNA umgeschrieben (2.3.13). Reaktionsansätze wurden wie in Tabelle 18 beschrieben pipettiert, wobei 3 μl jeder cDNA als Input DNA verwendet wurden. Als Primer für die Amplifikation von HIV Transkripten wurden die Primer HIV fw und HIV rv (2.1.3) verwendet, welche Sequenzen aus HIV *nef* amplifizieren. Als zelluläres Referenzgen wurde RNA Polymerase II benutzt (Pol fw, Pol rv; 2.1.3). Alle Proben wurden in Duplikaten auf eine qPCR Platte pipettiert und jeder Lauf wurde insgesamt zweimal durchgeführt. Der Ablauf einer qPCR Reaktion ist in Tabelle 19 dargestellt.

Die Auswertung erfolgte in Microsoft Excel, wobei zuerst der Mittelwert der Duplikate gebildet wurde. Im Anschluss wurde der ΔCp Wert errechnet, indem die Differenz aus dem $\text{Cp-Wert}_{\text{HIV}}$ und $\text{Cp-Wert}_{\text{Referenzgen}}$ der gleichen Probe gebildet wurde. Um sämtliche Proben auf die Negativkontrolle (= uninfiizierte Zellen) zu beziehen wurde als nächstes der $\Delta\Delta\text{Cp}$ Wert bestimmt. Hierfür wurde der Mittelwert der ΔCp -Werte der Negativkontrollen von allen

anderen ΔC_p Werten abgezogen. Schließlich wurde die Änderung der HIV-Transkripte in Bezug auf die Negativkontrolle mit Hilfe der Formel $2^{-\Delta\Delta C_p}$ berechnet [163].

Absolute Quantifizierung von HIV Proviren

Um die Anzahl an HIV Proviren in einer Zellpopulation zu bestimmen, wurde genomische DNA (2.3.11) aus den Zellen isoliert. Als Standard für eine absolute Quantifizierung wurden Verdünnungen genomischer DNA aus TH4-7-5 (2.1.7) verwendet. Bei dieser Zelllinie ist bekannt, dass 30 ng gDNA 10000 Zellgenomen und 5000 HIV Proviren entsprechen [149]. Alle Reaktionsansätze wurden wie in Tabelle 18 pipettiert, wobei jede Probe als Duplikat auf eine qPCR Platte aufgetragen wurde. Als Primer für HIV Proviren wurden BK1F und BK1R, welche im viralen *Gag* binden, verwendet und als zelluläres Referenzgen wurde β -globin (β -globin fw, β -globin rv; 2.1.3) amplifiziert. Der Reaktionsablauf einer Provirusbestimmung ist in Tabelle 20 zu sehen. Für die Auswertung wurde zum einen die Anzahl an Zellen (bestimmt aus TH4-7-5 Standard) gegen den C_p -Wert der entsprechenden TH4-7-5 Verdünnung aufgetragen, zum anderen wurde die Anzahl an Proviren (bestimmt aus TH4-7-5 Standard) gegen den C_p -Wert aufgetragen. Somit war es möglich auch für die zu testenden Proben sowohl Zellzahl, als auch die Anzahl an Proviren zu bestimmen. Als letztes wurde der Quotient aus Proviren und Zellzahl bestimmt.

Tabelle 20: Reaktionsablauf einer qPCR zur Bestimmung der HIV Proviren in einer Zellpopulation.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklus	SYBR Green Messung
Denaturierung	95 °C	10	1	Nein
Denaturierung	95 °C	1 s	8	Nein
Hybridisierung	65 °C	1 s		Nein
Elongation	72 °C	30 s		Nein
Denaturierung	95 °C	1 s	40	Nein
Hybridisierung	55 °C	1 s		Nein
Elongation	72 °C	30		Ja
Schmelzkurve	65 – 97 °C	+ 2,2 °C/s	1	Ja, durchgehend

2.3.15 Erstellen einer MiSeq Bibliothek

Die MiSeq Plattform von Illumina ist eine NGS-basierte Plattform, mit der es möglich ist PCR Amplikons, kleine Genome oder bestimmte Genabschnitte zu sequenzieren. In dieser Arbeit wurden verschiedene HIV-infizierte Zellen mit CRISPR/Cas9 behandelt. Um festzustellen welche Indel Mutationen durch CRISPR/Cas9 erzeugt wurden, wurde genomische DNA aus den Zellen isoliert (2.3.11) und der mutierte Bereich wurde mittels PCR (2.3.1) amplifiziert.

Die PCR Amplikons wurden im Anschluss einer Sequenzierung mittels MiSeq, welche auf dem Prinzip „Sequencing by Synthesis“ beruht [164] unterzogen. Um eine geeignete Amplikon Bibliothek zu erzeugen wurden, nach der Isolation von genomischer DNA, folgende Schritte durchgeführt: (a) Herstellung des PCR Amplikons, (b) Aufreinigung der PCR Produkte, (c) Index PCR, (d) Aufreinigung der PCR Produkte, (e) Quantifizierung, Normalisierung, Pooling der Bibliothek, (f) Denaturierung und Laden der, (g) MiSeq Sequenzierung.

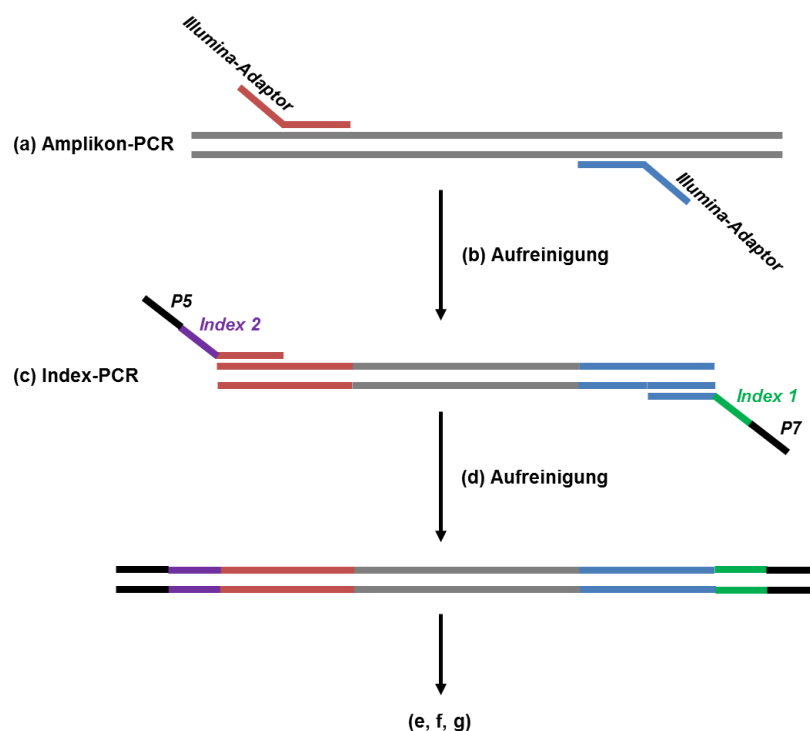


Abbildung 14: Schematischer Ablauf zum Erstellen einer MiSeq Bibliothek. (a) Amplikon PCR, (b) Aufreinigung der PCR Produkte, (c) Index PCR, (d) Aufreinigung der PCR Produkte, (e) Quantifizierung, Normalisierung, Pooling der Bibliothek, (f) Denaturierung und Laden der, (g) MiSeq Sequenzierung, welche von den Sequenzen P5 und P7 initiiert wird.

(a) Herstellung des PCR Amplikons

Um mutierte Bereiche innerhalb des HIV-1 LTRs zu untersuchen, wurde dieser Bereich mittels PCR mit einer Pfu Polymerase amplifiziert (2.3.1). Als Primer für LAI Sequenzen wurden MiSeqLAI und MiSeqRv (2.1.3) verwendet und als Primer für NL4-3 Sequenzen MiSeqNL43 und MiSeqRv (2.1.3). Während der PCR wurden die PCR Produkte an beiden Enden mit von Illumina vorgegebenen Adapter-Sequenzen (Abbildung 14) versehen. 5 µl

der PCR Produkte wurden auf ein Agarosegel (2.3.3) geladen, um den Erfolg der PCR zu kontrollieren.

(b) Aufreinigung der PCR Produkte

Die PCR Produkte aus (a) wurden mit dem NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (2.3.4) aufgereinigt und mit 30 µl MilliQ Wasser eluiert.

(c) Index PCR

Um die einzelne Proben mit individuellen Indizes zu versehen wurden die aufgereinigten PCR Produkte erneut mit einer Pfu Polymerase (2.3.1) amplifiziert. Sämtliche Primer waren im Nextera Index Kit (2.1.2) enthalten. Die Amplifikation erfolgte über die Bindung der Primer an die zuvor angehängten Adaptersequenzen. Gleichzeitig wurde jede einzelne Probe mit einer individuellen Kombination aus N7 und S5 Indizes versehen (Abbildung 15). 5 µl jeder Probe wurden auf ein Agarosegel geladen (2.3.3), um den Erfolg der PCR zu überprüfen.

	N701_TAAGCGA N702_CGTACTAG N703_AGGCAGAA N704_TCCTGAGC N705_GGACTCCT				
S502_CTCTCTAT	1	2	3	4	5
S503_TATCCTCT	6	7	8	9	10
S504_AGAGTAGA	11	12	13	14	

Abbildung 15: Schema der Index PCR. Alle Proben (1-14) wurden mit einer spezifischen Primer Kombination (N701-705/S502-504) amplifiziert. Die Bindung der Primer an die Ausgangs-DNA erfolgte über die zuvor angefügten Adaptersequenzen. Die Index-Sequenzen sind nach den Primer Namen angegeben.

(d) Aufreinigung der PCR Produkte

Die PCR Produkte aus (c) wurden mit dem NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (2.3.4) aufgereinigt und mit 30 µl MilliQ Wasser eluiert.

(e) Quantifizierung, Normalisierung, Pooling der Bibliothek

Die Konzentrationen sämtlicher Proben wurde mit Hilfe des Qubit in ng/µl gemessen (2.3.8). Mit Formel 4 wurde für jede Probe die Konzentration in nM umgerechnet. Nachdem jede Probe durch Verdünnung mit 10 mM Tris pH 8 auf 4 nM eingestellt wurde, wurde von jeder

Probe ein 5 µl Aliquot entnommen und die einzelnen Aliquots wurden gepoolt. Somit wurden die einzelnen Proben zu einer gemeinsamen Amplikon Bibliothek vereinigt.

$$\text{Konzentration [nM]} = \frac{\text{Konzentration [ng/}\mu\text{l]}}{660 \text{ g/mol} * \text{Amplikongröße}} * 10^6$$

Formel 4: Um die Konzentration einer Probe in nM umzurechnen wurde die gemessenen Konzentration [ng/µl] durch das Produkt aus 660 g/mol (= Molare Masse eines Basenpaares) und der Amplikongröße (hier: 450bp) geteilt. Das Ergebnis wird mit 10^6 multipliziert.

(f) Denaturierung und Laden der Bibliothek, (g) MiSeq Sequenzierung

Die gepoolte Amplikon Bibliothek wurde am Genom Analysezentrum (GAC) des Helmholtz Zentrum München weiter bearbeitet. Zuerst wurden die Amplikons denaturiert, hierfür wurden 5 µl der Bibliothek mit 5 µl 0,2 N NaOH gemixt und für 5 min bei RT inkubiert. Die nun denaturierte DNA wurde mit HT1 Puffer auf 20 pM verdünnt und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

Als interne Kontrolle für den Erfolg der Sequenzierung wird bei Illumina eine bekannte Standard-Bibliothek zusammen mit der unbekannten Probe sequenziert. Somit ist es möglich Aussagen über die Qualität eines Laufs zu machen. Als Standard während der MiSeq Sequenzierung dient eine Amplikonbibliothek des Bakteriophagen PhiX. Das Genom von PhiX ist bekannt und kann deswegen als interne Kontrolle genutzt werden. 2 µl der PhiX Bibliothek (10 nM) wurden mit 3 µl 10 mM Tris pH 8,5 gemischt. Im Anschluss wurden 5 µl der PhiX Kontrolle mit 5 µl 0,2 N NaOH gemischt und für 5 min bei RT zur Denaturierung der DNA inkubiert. Die PhiX Kontrolle wurde mit HT1 Puffer auf 20 pM verdünnt und auf Eis gelagert.

Die Amplikonbibliothek wurde mit dem PhiX Standard gemixt und für 2 min bei 96 °C inkubiert, bevor sie in eine MiSeq Reagent v2 Kartusche geladen wurde. Ausgehend von den Sequenzen P5 und P7 (Abbildung 14) wurde die Bibliothek sequenziert. Die erhaltenden Daten wurden mit Hilfe der Software Unipro UGENE 1.24.2 [159] und Mega7 [158] analysiert.

2.4 Statistische Auswertung

Statistische Auswertungen wurden mit Hilfe von GraphPad Prism 5 durchgeführt. Hierfür wurden die Werte aller Wiederholungen eines Experiments in das Programm übertragen. Die Mittelwerte verschiedener Populationen wurden mit einer one-way ANOVA und einem darauffolgenden Turkey's Multiple Comparison Test verglichen. Anhand der p Werte konnte

gezeigt werden, ob sich die Mittelwerte verschiedener Populationen signifikant voneinander unterscheiden. Ab einem Wert von $p \leq 0,05$ gilt ein Unterschied als signifikant. Verschiedene p Werte wurden wie folgt in Graphen dargestellt. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; n.s. = nicht signifikant.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung eines AAV Vektors für die Transduktion von Astrozyten und neuralen Progenitorzellen

AAVs stellen ein vielseitiges Werkzeug dar, um verschiedenste Zelltypen effektiv zu transduzieren. Durch Modifikationen der Kapsidsequenz wird die Anzahl der AAV Varianten weiter erhöht und es wird somit ermöglicht Varianten mit individuellen Transduktionsmustern zu identifizieren.

3.1.1 Screening einer AAV Bibliothek zur Identifizierung eines AAV Vektors für die Transduktion von HNSC.100 Zellen

Um einen geeigneten AAV Vektor zu identifizieren, der sowohl proliferierende (= neurale Progenitoren) als auch differenzierte (= Astrozyten-angereicherte) HNSC.100 Kulturen transduziert, wurde eine AAV-Bibliothek aus der AG Grimm (Universitätsklinikum Heidelberg, Lehrstuhl für Virologie) getestet. Die AAV Bibliothek bestand aus 5 Wildtyp AAVs (AAV1, 2, 6, 8, 9) und 30 modifizierten AAV Varianten. Modifiziert wurden die Kapsidsequenzen der AAVs mit Hilfe der „Peptid-Display“ Methode (1.2.3.2), wobei 6 verschiedene Peptidsequenzen (P1–P6) an Positionen der Kapsidsequenzen eingeführt wurden, die nach der Virusproduktion auf deren Oberfläche exponiert sind. Jeder AAV Vektor enthielt einen ubiquitären CMV Promotor, der die Expression eines EYFP Reporters kontrolliert. Für das AAV Screening wurden zwei 96-well Platten proliferierende HNSC.100 (= prol HNSC.100) Zellen ausgesät und die Zellen wurden im Anschluss mit der AAV Bibliothek transduziert. Zwei weitere 96-well Platten mit proliferierenden HNSC.100 Zellen wurden differenziert und die differenzierten HNSC.100 Zellen (= diff. HNSC.100) wurden ebenfalls mit der AAV Bibliothek transduziert (2.2.3, 2.2.5). Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und mit Hilfe von Durchflusszytometrie (2.2.12) auf die Expression von EYFP und damit auf eine erfolgreiche Transduktion analysiert.

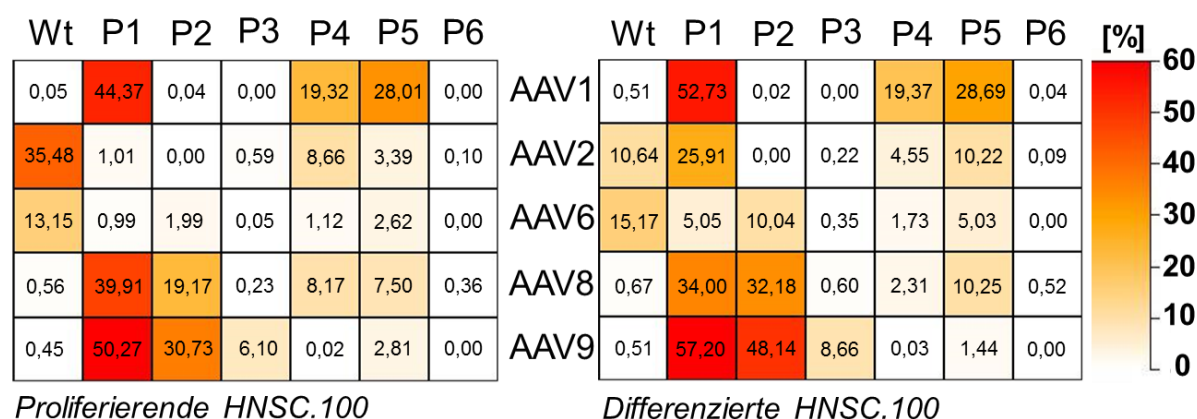


Abbildung 16: Identifizierung eines AAV Vektors für die Transduktion von HNSC.100 Zellen. Sowohl proliferierende als auch differenzierte HNSC.100 Zellpopulationen wurden mit einer AAV-Bibliothek transduziert. Die Bibliothek bestand aus 5 Wildtyp AAVs und 30 modifizierten AAV Varianten, jeder Vektor enthält einen CMV Promotor und einen EYFP Reporter. 48 h nach der Transduktion wurden die Zellen geerntet und mit Hilfe von Durchflusszytometrie auf die Expression des EYFP Reporters analysiert. Abgebildet ist die Transduktionseffizienz als Prozentsatz an EYFP-positiven Zellen. Verglichen mit den Wildtyp AAVs zeigen die Varianten mit den Peptidinsertionen P1 und P2 den höchsten Prozentsatz an transduzierten Zellen. Der Vektor AAV9P1 hat bei beiden Zelltypen die höchste Transduktionseffizienz.

Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse der Transduktion von HNSC.100 Zellen mit der AAV-Bibliothek. Die Transduktion von beiden Zelltypen mit Wt AAV1 zeigt kein Ergebnis, während die Insertion von P1 in das AAV1 Kapsid zu einem deutlichen Anstieg der Transduktion führt (44,37% für prol. HNSC.100 und 52,73% für diff. HNSC.100). Auch die Insertionen von P4 und P5 in das AAV1 Kapsid erhöhen die Transduktionseffizienz, während die Peptide P2, P3 und P6 keinen Unterschied zum Wildtyp AAV1 zeigen.

Unter den Wildtyp AAVs zeigen lediglich AAV2 und AAV6 eine nachweisbare Transduktion von prol. und diff. HNSC.100 Zellen. Während bei prol. HNSC.100 die Insertion von allen Peptiden in AAV2 oder AAV6 zu einer Verschlechterung der Transduktion führt, zeigt bei den diff. HNSC.100 Zellen AAV2P1 eine Verbesserung der Transduktion im Vergleich zum Wildtyp (von 10,64% auf 25,91%). Alle anderen Insertionen im AAV2 oder AAV6 Kontext führen aber auch bei diff. HNSC.100 zu einer Verschlechterung der Transduktionseffizienz im Vergleich zu den Wildtypen.

Die Insertion von P1 und P2 führt sowohl im AAV8 als auch im AAV9 Kontext zu einer verbesserten Transduktion von HNSC.100 Zellen im Vergleich zu Wt AAV8 und Wt AAV9. Die Insertionen der anderen Peptide im AAV8 oder AAV9 Kontext zeigen hingegen nur schwache Transduktionsraten auf.

AAV9P1 (Abbildung 17) zeigt sowohl bei proliferierenden als auch bei differenzierten HNSC.100 Zellen die höchste Transduktionseffizienz (50,27% für prol. HNSC.100 und 57,20% für diff. HNSC.100) und wird im weiteren Verlauf der Arbeit genauer untersucht. Abbildung 17 zeigt einen Sequenzvergleich des VP1 Proteins von AAV9 und AAV9P1. Durch das Peptide-Display wurde ein zusätzliches Integrinbindemotiv (rot unterstrichen) in die Kapsidsequenz eingebracht.

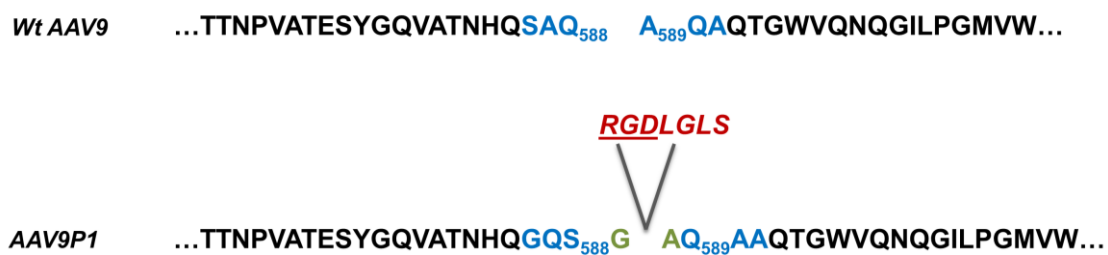


Abbildung 17: Vergleich von Wt AAV9 und AAV9P1 Kapsidsequenz. Die obere Sequenz stellt einen Teil der Wildtyp AAV9 Kapsidsequenz dar. Die Nummerierung bezieht sich auf die Startamino­säure des VP1 Proteins. Zwischen Q₅₈₈ und A₅₈₉ wurde das in der unteren Zeile beschriebene P1 Peptid kloniert (RGDLGLS, rot). Das unterstrichene Aminosäurenmotiv bildet ein Integrinbindemotiv. Durch die Klonierung wurden zusätzlich die Aminosäuren SAQ₅₈₈ zu GQS und die Aminosäuren A₅₈₉QA zu QAA mutiert (blau). Zudem wurde um das P1 Peptid ein Glycin (G) und ein Alanin (A) eingefügt (grün).

3.1.2 Zellspezifität von AAV9P1 in verschiedenen Zelllinien des ZNS

Ziel dieser Arbeit ist es einen AAV Vektor zu entwerfen, der effektiv Astrozyten transduziert. Da bis jetzt nur Astrozyten und neurale Progenitorzellen mit AAV9P1 transduziert wurden, wurde mit den folgenden Experimenten das Transduktionsverhalten von AAV9P1 im Bezug auf verschiedene Zellen des Zentralen Nervensystems (ZNS) getestet.

Das Screening der AAV-Bibliothek (3.1.1) wurde mit Vektor-haltigen Zelllysaten durchgeführt. Um AAV9P1 genauer zu untersuchen wurden für die folgenden Transduktionen AAV9P1 Vektoren verwendet, die zuvor über einen Iodixanolgradienten aufgereinigt wurden (2.2.6).

Abbildung 18 zeigt prol. und diff. HNSC.100 Zellen, die mit einer MOI von $1 \cdot 10^5$ Partikeln pro Zelle durch AAV9P1 transduziert wurden. Beide Zelltypen wurden durch Immunfluoreszenzfärbung (2.2.9) auf spezifische zelluläre Marker untersucht. Als Marker für neurale Progenitorzellen wurde Nestin und als Marker für Astrozyten GFAP verwendet. In der oberen Reihe (= prol. HNSC.100) ist zu sehen, dass Nestin-positive Zellen (rot) gleichzeitig auch EYFP (grün) exprimieren und somit eine positive Transduktion zeigen. Es

wurden 200 Nestin-positive Zellen willkürlich ausgesucht und auf das Vorhandensein von EYFP ausgezählt (2.2.11). Es ergab sich mit 69,5% eine höhere Transduktionseffizienz durch aufgereinigte AAV9P1 Vektoren als durch die Transduktion mit Zelllysaten wie im Abschnitt 3.1.1. Auch die Transduktion von diff. HNSC.100 (untere Reihe) war mit 72,0% EYFP-positiven Zellen, die gleichzeitig den Astrozytenmarker GFAP exprimieren, höher als bei der Transduktion mit Zelllysaten.

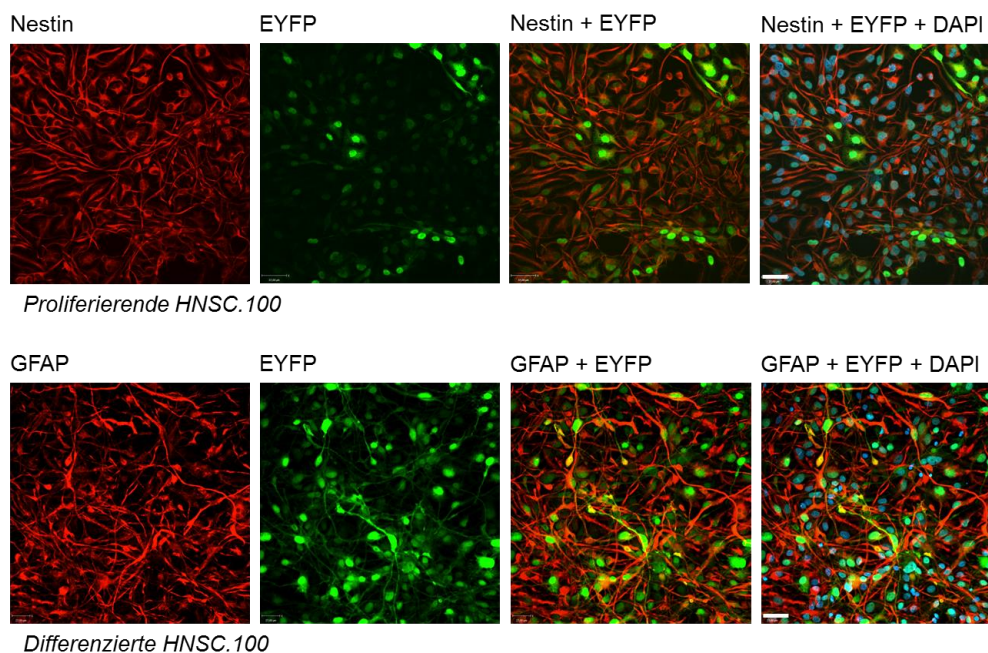


Abbildung 18: Transduktion von HNSC.100 Zellen mit Iodixanolgradient-gereinigtem AAV9P1. Profilierende HNSC.100 und differenzierte HNSC.100 Zellen wurden mit AAV9P1 transduziert ($\text{MOI } 1 \times 10^5$). 48 h nach der Transduktion wurden die Zellen fixiert und auf die Expression der zellulären Marker Nestin (prol. HNSC. 100) und GFAP (diff. HNSC.100) gefärbt. Der Größenstandard entspricht 18 μm .

Neben HNSC.100 Zellen wurden im Folgenden noch weitere Zelllinien, die sich von verschiedenen Zelltypen des ZNS ableiten, mit AAV9P1 transduziert. Weitere astrozytäre Zelllinien sind TH4-7-5, U-251 MG und U-87 MG, während LAN-5 als Model für Neuronen und CHME-3 als Model für Mikrogliazellen verwendet wurden (2.1.7). Alle Zelltypen wurden mit einer MOI von 1×10^5 transduziert, 48 h nach der Transduktion geerntet und mittels Durchflusszytometrie analysiert (2.2.5, 2.2.2, 2.2.12).

Die Analyse der Transduktionseffizienz (Abbildung 19) von AAV9P1 mittels Durchflusszytometrie ergab $91,8 \pm 5,1\%$ transduzierte prol. HNSC.100 und $76,2 \pm 15,6\%$ diff. HNSC.100. Mit $92,3 \pm 11,7\%$ transduzierter Zellen für TH4-7-5, $98,1 \pm 0,5\%$ für U-251

MG und $61,8 \pm 3,5\%$ für U-87 MG wurden auch die restlichen astrozytären Zelllinien erfolgreich transduziert. Die neurale Zelllinie LAN-5 und die Mikrogliazelllinie CHME-3 hingegen zeigen mit $3,1 \pm 0,9\%$ und $6,0 \pm 1,9\%$ EYFP-positiver Zellen keine effiziente Transduktion durch AAV9P1.

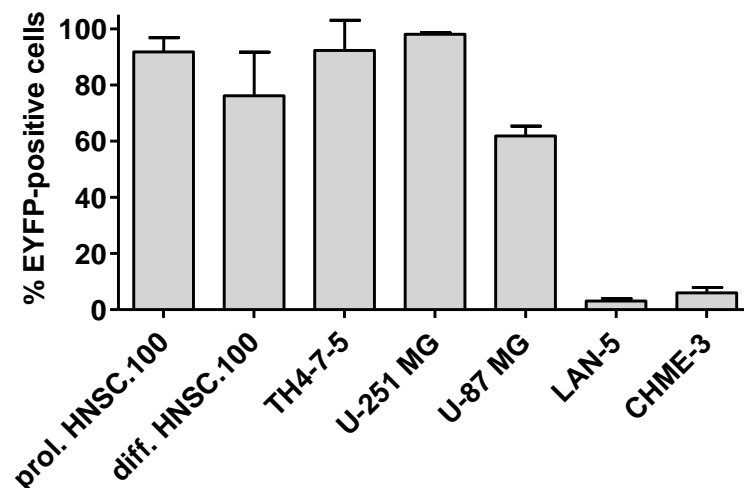


Abbildung 19: Transduktion verschiedener Zelllinien des ZNS mit AAV9P1 (MOI $1 \cdot 10^5$). 48 h nach der Transduktion wurden die Zellen geerntet und mittels Durchflusszytometrie auf die Expression von EYFP analysiert. Sowohl neurale Progenitorzellen (prol. HNSC.100) als astrozytäre Zelllinien (diff. HNSC.100, TH4-7-5, U-251 MG, U-87 MG) zeigen hohe Transduktionsraten durch AAV9P1, während LAN-5 (Neuroblastomzellen) und CHME-3 (Mikrogliazellen) nicht effizient transduziert werden.

3.1.3 Transduktion von hiPSC-abgeleiteten ZNS Zellen durch AAV9P1

Im Abschnitt 3.1.2 konnte bereits gezeigt werden, dass AAV9P1 in der Lage ist neurale Progenitorzellen und Astrozyten effizient zu transduzieren, während Neuronen und Mikrogliazellen nicht transduziert wurden. Da es sich bei den vorangegangenen Experimenten um die Transduktion von immortalisierten Zelllinien bzw. um Tumorzelllinien handelte, wurden für die folgenden Experimente Zellen des ZNS verwendet, die von hiPSC (2.1.7) abgeleitet wurden. Da die Verwendung von primären humanen Gehirnzellen sehr aufwendig und kostspielig ist, bieten hiPSCs und davon abgeleitete Zellen ein gutes alternatives Zellmodell.

Vor der Transduktion von hiPSC-abgeleiteten ZNS Zellen mit AAV9P1 wurden die einzelnen Zelltypen auf die Expression von spezifischen Markern untersucht, um eine erfolgreiche Differenzierung zu bestätigen. Abbildung 20 zeigt die Färbung von neuronalen

Progenitorzellen, Astrozyten und kortikalen Neuronen mit den jeweiligen Markern Nestin, GFAP, S100 beta und beta III Tubulin (jeweils in rot; 2.2.9). Jeder Zelltyp lässt sich anhand der Expression eines spezifischen Zellmarkers identifizieren, wobei neurale Progenitorzellen den Marker Nestin, Astrozyten die Marker GFAP und S100 beta und kortikale Neuronen den Marker beta III Tubulin exprimieren (1.1.5.1). Neben der Markerexpression unterscheiden sich die Zellen auch auf Grund ihrer Morphologie deutlich voneinander.

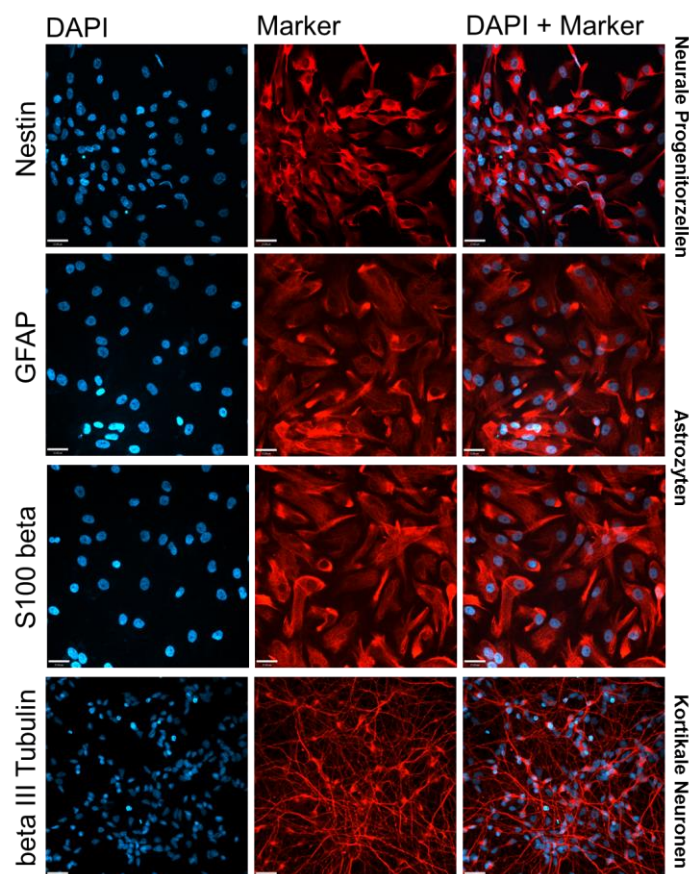


Abbildung 20: Analyse der Markerexpression von hiPSC-abgeleiteten ZNS Zellen.

Verschiedene ZNS Zellen wurden auf die Expression verschiedener zellulärer Marker (rot) untersucht. Neuronale Progenitorzellen (1. Reihe) wurden auf Nestin gefärbt, Astrozyten (2. und 3. Reihe) auf GFAP und S100 beta und kortikale Neuronen (4. Reihe) auf beta III Tubulin. Zellkerne aller Zelltypen wurden mit DAPI (blau) angefarbt. Der Größenstandard entspricht 37 μm .

Nachdem die erfolgreiche Differenzierung von hiPSC in neuronale Progenitorzellen, Astrozyten und kortikale Neuronen durch die Expression von spezifischen Markern bestätigt wurde, wurden diese Zellen mit AAV9P1 ($\text{MOI } 1 \cdot 10^5$) transduziert. 48 h nach der Transduktion wurden die Zellen geerntet und mittels Durchflusszytometrie auf die Expression von EYFP

analysiert (2.2.5, 2.2.12). Die Ergebnisse der Transduktion sind in Abbildung 21 zu sehen. Neurale Progenitorzellen (NPs) zeigen eine Transduktionsrate von $31,1 \pm 9,5\%$, Astrozyten hingegen sind mit $88,2 \pm 0,8\%$ EYFP-positiven Zellen deutlich stärker transduziert. Korticale Neuronen hingegen lassen sich durch AAV9P1 kaum transduzieren ($8,7 \pm 0,5\%$).

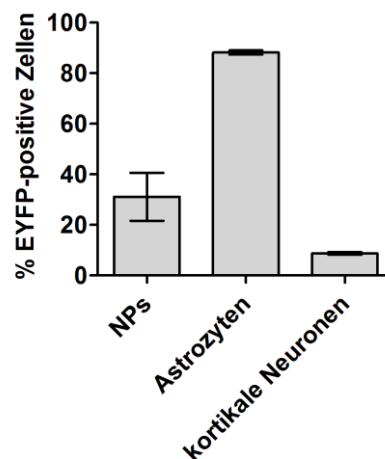


Abbildung 21: Transduktion von hiPSC-abgeleiteten ZNS Zellen mit AAV9P1. Neurale Progenitorzellen (NPs), Astrozyten und korticale Neuronen wurden mit AAV9P1 transduziert ($\text{MOI } 1 \cdot 10^5$). 48 h nach der Transduktion wurden die Zellen geerntet und mit Hilfe von Durchflusszytometrie auf die Expression von EYFP untersucht. Während Astrozyten einen hohen Anteil an EYFP-positiven Zellen zeigen, wurden korticale Neuronen kaum transduziert. NPs zeigen eine moderate Transduktion.

3.1.4 Transduktion von humanen Organoiden durch AAV9P1

Um das Transduktionsverhalten von AAV9P1 in gemischten Zellpopulationen zu untersuchen, wurden die folgenden Experimente mit Organoiden durchgeführt. Bei Organoiden handelt es sich um dreidimensionale Zellstrukturen, bestehend aus hiPSC-abgeleiteten Astrozyten und Neuronen. Organoiden erlauben es die Komplexität eines menschlichen Organs *in vitro* besser darzustellen als Einzel-Zellsysteme (2.1.7; [165]).

Da es nicht möglich war die genaue Zellzahl eines Organoids zu bestimmen, um eine genaue Menge an AAV9P1 Vektoren pro Zelle (=MOI) für die Transduktion zu verwenden, wurden zwei Organoiden, die sich beide in der gleichen Zellkulturschale befanden, mit $1,5 \cdot 10^{11}$ AAV9P1 Vektoren pro 1 ml Zellkulturmedium transduziert (2.2.5).

Abbildung 22A zeigt einen Organoidschnitt, der auf die Expression des Astrozytenmarkers GFAP (obere Reihe) und des Neuronenmarkers beta III Tubulin (untere Reihe) untersucht wurde (2.2.10). Da beide Markerproteine und damit beide Zelltypen vorhanden sind, konnte

die erfolgreiche Bildung eines Organoids bestätigt werden.

In Abbildung 22B ist eine Phasenkontrastaufnahme eines Organoidschnitts zu sehen. Die erfolgreiche Transduktion des Organoids durch AAV9P1 ist anhand der Expression von EYFP (grün) sichtbar und zeigt, dass AAV9P1 in der Lage ist große Teile des Organoids zu transduzieren.

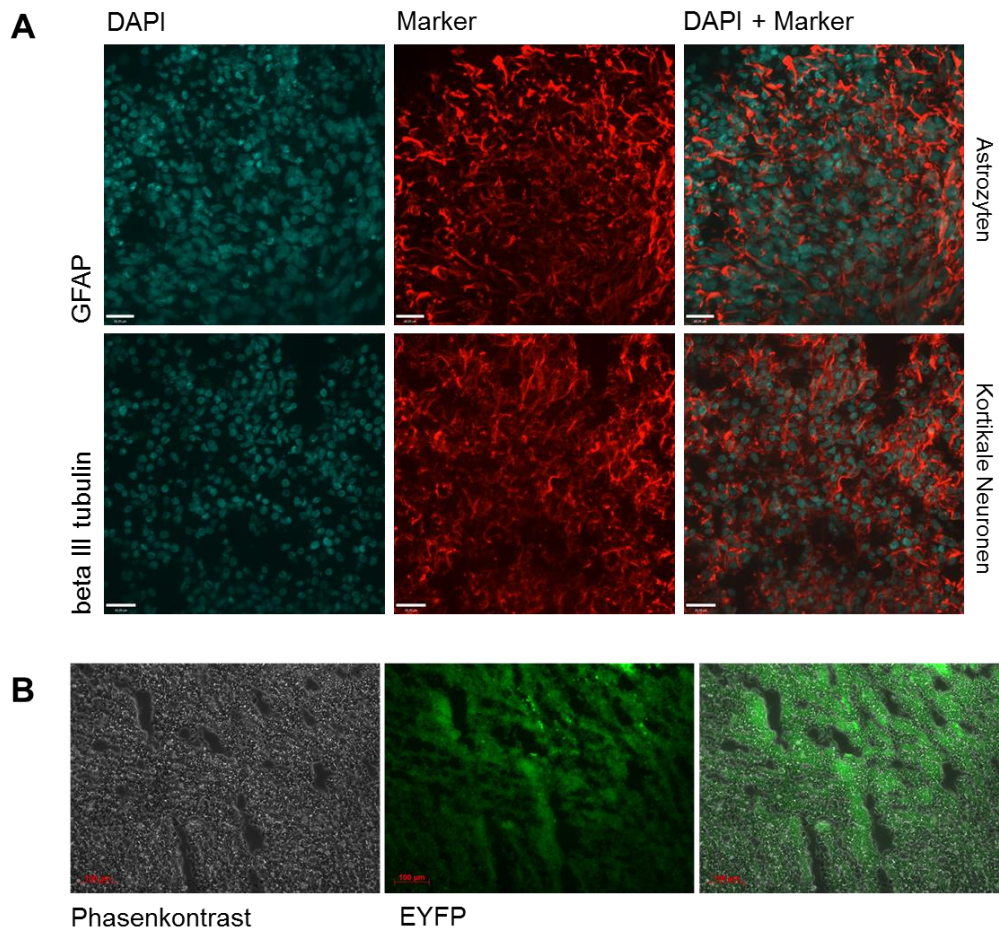


Abbildung 22: Transduktion von Organoiden mit AAV9P1. (A) Organoidschnitte wurden auf die zellulären Marker GFAP (= Astrozyten) und beta III Tubulin (= Neuronen) gefärbt. Das Vorhandensein beider Zelltypen bestätigt eine erfolgreiche Organoidbildung. Größenstandard = 18 μm . (B) Phasenkontrastaufnahme eines Organoidschnitts. Die Expression von EYFP (grün) bestätigt eine erfolgreiche Transduktion durch AAV9P1. Größenstandard = 100 μm .

Um festzustellen welcher Zelltyp innerhalb eines Organoids durch AAV9P1 transduziert wurde, wurde die Ko-Lokalisation von EYFP mit GFAP (=Astrozyten) oder beta III Tubulin (=Neuronen) untersucht. Organoidschnitte wurden hierfür, wie im Abschnitt 2.2.10 beschrieben, simultan mit Antikörpern gegen GFAP und beta III Tubulin gefärbt. Im

Anschluss wurden 100 Mikroskopiebilder auf die Ko-Lokalisation von EYFP und GFAP/beta III Tubulin untersucht. Um 100 Mikroskopiebilder zu erhalten wurden 10 Organoidschnitte gefärbt und von jedem Schnitt wurden an unterschiedlichen Stellen 10 Bilder aufgenommen. Für jedes Bild wurde der Pearson Korrelationskoeffizient (PI) ermittelt (2.2.11). Dieser gibt an, ob ein EYFP Bildpunkt an der gleichen Stelle zu finden ist wie ein GFAP oder beta III Tubulin Bildpunkt. Der PI wird als Wert zwischen 1 (= Bildpunkte liegen genau aufeinander) und 0 (= keine Übereinstimmung von Bildpunkten) angegeben.

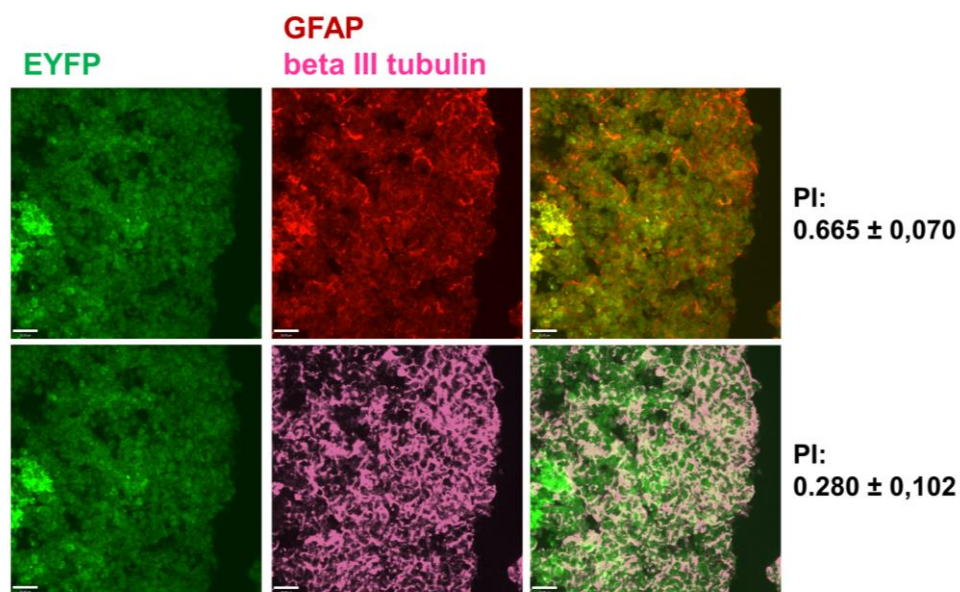


Abbildung 23: Analyse der EYFP Expression in AAV9P1-transduzierten Organoiden.

Ein exemplarischer Organoidschnitt wurde sowohl auf GFAP (obere Reihe, rot) also auch auf beta III Tubulin (untere Reihe, Magenta) gefärbt. Die durch die Transduktion mit AAV9P1 vermittelte Expression von EYFP ist in grün dargestellt. Mit einem Pearson Korrelationskoeffizienten von 0,665 zeigt sich, dass vor allem GFAP-positive Zellen transduziert wurden, während beta III Tubulin-positive Zellen kaum transduziert wurden (PI=0,280). Größenstandard = 18 µm.

In Abbildung 23 ist zweimal der gleiche Organoidauschnitt zu sehen. Die Expression von EYFP (grün) zeigt eine erfolgreiche Transduktion durch AAV9P1. Der Schnitt wurde auf die Expression des Astrozytenmarkers GFAP (obere Reihe, rot) und auf die Expression des Neuronenmarkers beta III Tubulin (untere Reihe, Magenta) untersucht. Der aus 100 Bildern errechnete PI bestätigt, dass EYFP stärker mit GFAP (PI=0,665 ± 0,070) korreliert als mit beta III Tubulin (PI=0,280 ± 0,102) und zeigt somit, dass AAV9P1 in einer gemischten Zellpopulation bevorzugt Astrozyten transduziert.

3.2 Untersuchung und Optimierung des Transduktionsverhaltens von AAV9P1

Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.1 zeigen, dass AAV9P1 in der Lage ist spezifisch Astrozyten zu transduzieren, was AAV9P1 zu einem interessanten Vektor für eine Vielzahl von verschiedenen Anwendungen macht. Um weitere Informationen über das Transduktionsverhalten von AAV9P1 zu erhalten, wurden im Folgenden verschiedene Zelltypen außerhalb des ZNS mit AAV9P1 transduziert.

3.2.1 Transduktionsverhalten von AAV9P1 in verschiedenen Zelltypen

Um zu untersuchen, ob AAV9P1 Zelltypen außerhalb des ZNS transduziert, wurden verschiedene Zelllinien (2.1.7) mit einer MOI von $1 \cdot 10^5$ transduziert (2.2.5). 48 h nach der Transduktion wurden die Zellen geerntet (2.2.2) und mittels Durchflusszytometrie (2.2.12) auf die Expression von EYFP untersucht.

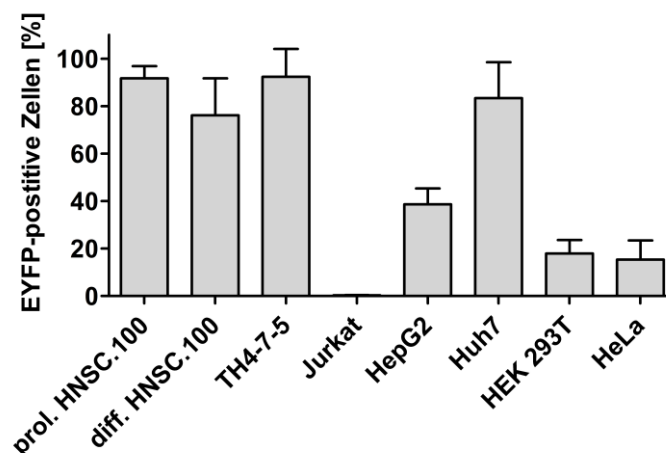


Abbildung 24: Transduktion verschiedener Zelllinien mit AAV9P1. Neuronale Progenitorzellen (prol. HNSC.100), Astrozyten (diff. HNSC.100, TH4-7-5), T-Lymphozyten (Jurkat), Leberzellen (HepG2, Huh7), HEK293T und HeLa Zellen wurden mit AAV9P1 transduziert (jeweils mit einer MOI von $1 \cdot 10^5$). 48 h nach der Transduktion wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie auf die Expression des EYFP Reporters untersucht. Neben ZNS Zellen transduziert AAV9P1 auch Leberzellen, HEK293T und HeLa Kulturen.

Die in Abbildung 24 dargestellten Balken zeigen die Transduktionsrate von AAV9P1 in verschiedenen Zelllinien. Wie bereits gezeigt, transduziert AAV9P1 sowohl prol. HNSC.100, als auch diff. HNSC.100 Kulturen. Auch TH4-7-5 Kulturen wurden erneut erfolgreich transduziert. AAV9P1 war nicht in der Lage die CD4-positive T-Zelllinie Jurkat zu transduzieren. Die Leberzelllinien HepG2 und Huh7 zeigten mit $38,6 \pm 6,7\%$ und $83,4 \pm$

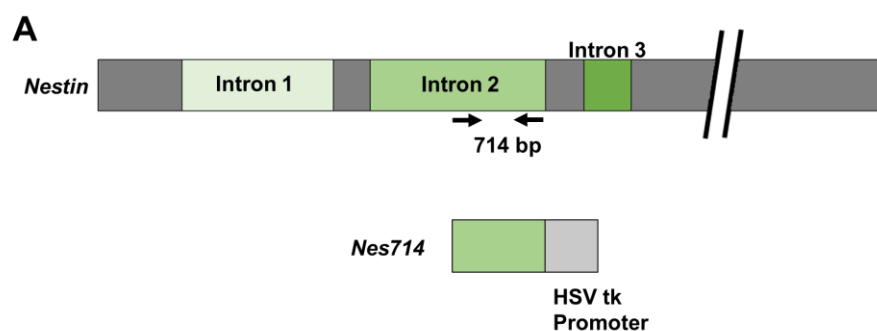
15,1% EYFP positiver Zellen unterschiedliche Transduktionsraten durch AAV9P1. Sowohl HEK293T als auch HeLa Zellen sind nur bedingt durch AAV9P1 transduzierbar ($17,9 \pm 5,7\%$ bzw. $15,3 \pm 8,1\%$). Es lässt sich festhalten, dass obwohl AAV9P1 nicht alle getesteten Zelllinien effektiv transduziert, AAV9P1 trotzdem nicht spezifisch für die Transduktion von ZNS Zellen verwendet werden kann.

3.2.2 Erhöhung der Spezifität durch zellspezifische Promotoren

Eine Möglichkeit die Zellspezifität eines viralen Vektors zu erhöhen ist die Verwendung eines zellspezifischen Promotors für die Expression des Transgens. Somit wird in nicht gewünschten Zelltypen das Transgen nicht exprimiert. In den folgenden Abschnitten werden zwei verschiedene Promotoren darauf getestet, ob sie in der Lage sind die durch AAV9P1 vermittelten Transgene ausschließlich in neuronalen Progenitorzellen und/oder Astrozyten zu exprimieren.

3.2.2.1 Das Nes714 Promotorkonstrukt

Nestin ist ein Intermediärfilamentprotein, das ein Marker für neurale Progenitorzellen ist (1.1.5.1). Lothian und Lendahl [138] haben das Nes714 Promotorkonstrukt hergestellt, welches in der Lage ist die Expression eines Reporters in transgenen Mäusen auf neurale Progenitorzellen (=Nestin positive Zellen) zu beschränken. Das Konstrukt besteht aus einem 107 bp langem Abschnitt des HSV tk Promotors (Herpes simplex Virus Thymidin Kinase), welcher zwar eine Transkriptionsstartstelle enthält aber alleine nicht in der Lage ist einen Reporter in neuronalen Progenitorzellen zu exprimieren. Zusätzlich zu dem HSV tk Promotor enthält das Konstrukt einen 714 bp langen Abschnitt des 2. Introns des humanen Nestingens (Abbildung 25A). Es konnte gezeigt werden, dass dieser 714 bp Abschnitt als Transkriptionsverstärker dient und zusammen mit dem HSV tk Promotor in der Lage ist Reporterexpression auf neurale Progenitorzellen *in vivo* zu limitieren [138].



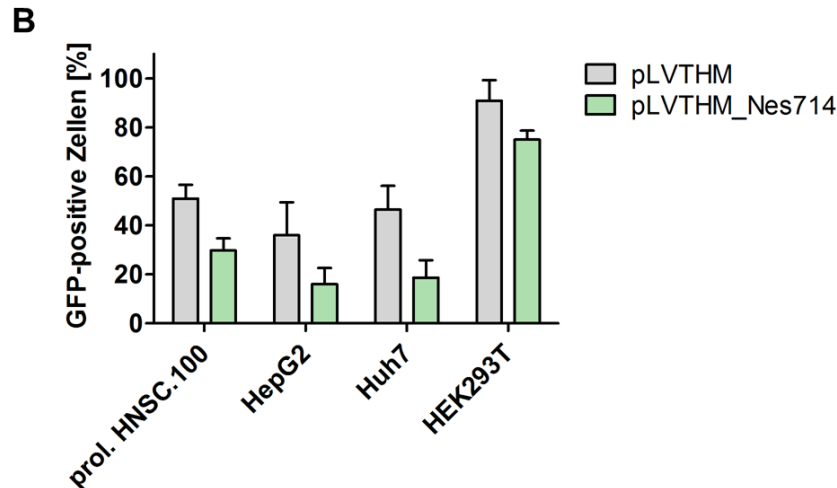


Abbildung 25: Transfektion von verschiedenen Zelllinien mit pLVTHM und pLVTHM_Nes714. (A) Schematische Übersicht des Nes714 Promotorkonstrukts, welches aus einem 714 bp Abschnitt des 2. Introns des humanen Nestins und einem minimalen HSV tk Promotor besteht. Die Abbildung ist an Lothian und Lendahl, 1997 angelehnt [138]. (B) Prolifizierende HNSC.100, HepG2, Huh7 und HEK293T Kulturen wurden mit 10 pg Plasmid DNA/Zelle transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie auf die Expression des GFP Reporters untersucht. Graue Balken zeigen Transfektionsraten mit pLVTHM (ubiquitärer EF1- α Promotor) und grüne Balken Transfektionsraten von pLVTHM_Nes714 (Nes714 Promotorkonstrukt). Es ist zu sehen, dass der Nes714 Promotor nicht in der Lage ist, die Transgenexpression auf prol. HNSC.100 Zellen zu beschränken.

Abbildung 24 zeigt, dass unter den getesteten Zelllinien vor allem die Leberzelllinien deutlich von AAV9P1 transduziert werden. Um zu untersuchen, ob das Nes714 Promotorkonstrukt in der Lage ist die Transgenexpression in Zellen außerhalb des ZNS zu verhindern, wurde es in das pLVTHM Plasmid kloniert. Somit ergab sich das Plasmid pLVTHM_Nes714 (Tabelle 7), welches einen GFP Reporter enthält. Verschiedene gut transduzierbare Zellen wurden mit 10 pg Plasmid DNA pro Zelle transfiziert (2.2.4) und 48 h nach der Transfektion geerntet (2.2.2, 2.2.3). Mit Hilfe von Durchflusszytometrie (2.2.12) wurde der Anteil an GFP positiven Zellen und somit der Anteil an Zellen, in denen das Nes714 Promotorkonstrukt aktiv war, bestimmt. Zum Vergleich wurden die gleichen Zellen mit pLVTHM (2.1.5) transfiziert. In diesem Plasmid steuert der ubiquitär aktive Promotor EF1- α die GFP Expression.

Als Kontrolle für eine erfolgreiche Transfektion wurden HEK293T, eine gut zu transfizierende Zelllinie, verwendet. Unter der Kontrolle beider Promotoren exprimieren HEK293T Zellen GFP ($90,9 \pm 8,5\%$ bei pLVTHM und $75,1 \pm 3,6\%$ bei pLVTHM_Nes714). Bei den prol. HNSC.100 Kulturen führt die Transfektion von pLVTHM zu $50,9 \pm 5,7\%$ GFP positiven Zellen und die Transfektion von pLVTHM_Nes714 zu $29,7 \pm 5,0\%$. Auch die beiden

Leberzelllinien (HepG2, Huh7) zeigen bei beiden Plasmiden GFP positive Zellen. Auch wenn der Anteil an GFP exprimierenden Zellen in allen Fällen bei Transfektion mit pLVTHM_Nes714 geringer ist als bei Transfektion mit pLVTHM, zeigt sich doch, dass das Nes714 Promotorkonstrukt nicht in der Lage ist die Transgenexpression auf neurale Progenitorzellen zu beschränken.

3.2.2.2 *Der gfaABC₁D Promotor*

GFAP (*engl.* glial fibrillary acidic protein) ist ein Intermediärfilamentprotein, welches in Astrozyten exprimiert wird. Der Promotor des humanen GFAP (*gfa2*) ist mit 2,2 kb Länge zu groß für eine AAV Verpackung. Lee *et al.*, 2008 waren in der Lage den *gfa2* Promotor (Abbildung 26A) auf die essentiellen Teile A, B, C, D und BP (=basaler Promotor) zu reduzieren [137]. Zusätzlich waren sie in der Lage innerhalb des C Segments ein Untersegment C1 zu identifizieren, welches den resultierenden Promotor *gfaABC₁D* die gleichen Expressionseigenschaften zuteilwerden ließ wie dem *gfa2* Promotor. Somit wurde ein auf 681 bp reduzierter Astrozyten-spezifischer Promotor etabliert, der in transgenen Mäusen die gleiche Expressionsverteilung wie *gfa2* zeigt [137].

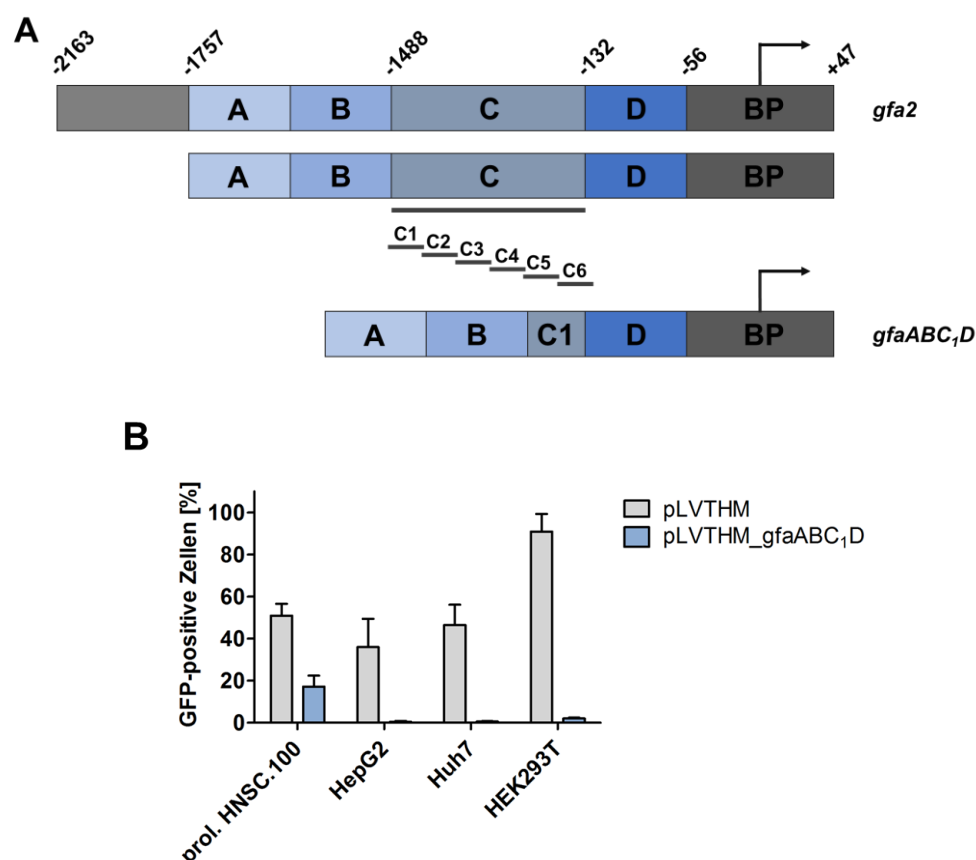


Abbildung 26: Transfektion von verschiedenen Zelllinien mit pLVTHM und

pLVTHM_gfaABC₁D. (A) Schematische Übersicht über der Entstehung des gfaABC₁D Promotors. Abbildung ist an Lee *et al.*, 2008 angelehnt [137]. (B) Proliferierende HNSC.100, HepG2, Huh7 und HEK293T Kulturen wurden mit pLVTHM (grau) und pLVTHM_gfaABC₁D (blau) transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Hilfe von Durchflusszytometrie auf die Expression von GFP untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass unter der Kontrolle des gfaABC₁D Promotors nur in prol. HNSC.100 Zellen GFP exprimiert wird.

Da AAV9P1 neben Astrozyten und neuronalen Progenitorzellen unter anderem auch Leberzellen (HepG2, Huh7) deutlich transduziert (Abbildung 24), wird im Folgenden getestet, ob der gfaABC₁D Promotor in der Lage ist die Expression eines Reportergens auf neurale Progenitoren und/oder Astrozyten zu beschränken. Hierfür wurde der Promotor in das pLVTHM Plasmid kloniert (2.1.5), das so entstandene Plasmid pLVTHM_gfaABC₁D (Tabelle 7) exprimiert einen GFP Reporter unter der Kontrolle von gfaABC₁D. Verschiedene Zelllinien wurden mit pLVTHM (EF1- α Promotor) oder pLVTHM_gfaABC₁D transfiziert (10 pg Plasmid DNA pro Zelle; 2.2.4). 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet (2.2.2, 2.2.3) und mittels Durchflusszytometrie auf die Expression von GFP analysiert (2.2.12). Da sich differenzierte Astrozyten nicht transfizieren lassen, wurden lediglich prol. HNSC.100 Zellen verwendet, welche aber auch eine geringe Menge an GFAP exprimieren [166], wodurch der gfaABC₁D Promotor aktiv sein sollte.

Abbildung 26B zeigt, dass sich alle verwendeten Zelllinien transfizieren ließen, da in allen Zelllinien nach der Transfektion mit pLVTHM, in dem GFP unter der Kontrolle des ubiquitären EF1- α Promotors steht, GFP exprimiert wird. Im Vergleich dazu zeigen nur prol. HNSC.100 GFP positive Zellen ($17,2 \pm 5,3\%$), wenn die Transkription des Reporters unter der Kontrolle des gfaABC₁D Promotors steht. Somit konnte gezeigt werden, dass der gfaABC₁D Promotor in diesem Experiment in der Lage ist die Expression auf ZNS Zellen zu beschränken.

Um den gfaABC₁D Promotor in einen AAV Kontext zu bringen, wurde der Promotor in das AAV Plasmid pBSU6 (2.1.5) kloniert, wodurch pBSU6_gfaABC₁D-EYFP entstand (Tabelle 7). Das klonierte Plasmid wurde benutzt um AAV9P1 Vektoren zu produzieren (2.2.6). Im Anschluss wurden verschiedene Zelltypen mit AAV9P1_gfaABC₁D-EYFP transduziert (MOI $1 \cdot 10^5$; 2.2.5), um zu überprüfen in welchen Zellen das EYFP Transgen exprimiert wird.

Abbildung 27 zeigt, dass AAV9P1_gfaABC₁D-EYFP in der Lage war sowohl in prol. HNSC.100 ($24,3 \pm 8,4\%$) als auch in diff. HNSC.100 ($61,7 \pm 0,1\%$) Kulturen für eine EYFP Expression zu sorgen. Auch TH4-7-5 Zellen zeigen eine EYFP Expression ($50,3 \pm 11,1\%$). Die Astrozytenzelllinien U-251 MG und U-87 MG hingegen können zwar durch AAV9P1 transduziert werden (Abbildung 19), aber sobald das EYFP unter der Kontrolle des

gfaABC₁D Promotors und nicht mehr unter der Kontrolle eines CMV Promotors steht, ist das Transgen kaum ($3,5 \pm 0,2\%$ EYFP positive U-87 MG Zellen) oder gar nicht detektierbar. Auch die neurale Zelllinie LAN-5 und die Mikrogliazelllinie CHME-3 zeigen keine EYFP Expression.

Vergleicht man Abbildung 27 mit Abbildung 24 so zeigt sich, dass Zelllinien, die nach der Transduktion mit AAV9P1_CMV-EYFP noch EYFP Signale zeigen, durch den Einsatz des gfaABC₁D Promotors nun nicht mehr in der Lage sind EYFP zu exprimieren (HepG2, Huh7, HEK293T, HeLa). Zusätzlich wurden noch PBMCs von zwei verschiedenen Spendern mit AAV9P1_gfaABC₁D-EYFP transduziert. Die Zellen wurden sowohl im stimulierten Zustand als auch nicht stimulierten transduziert. In keiner der Kulturen konnte eine EYFP Expression nachgewiesen werden.

Die Kombination von AAV9P1 mit dem gfaABC₁D Promotor führt zu einer sehr spezifischen Transgenexpression, die sich auf neurale Progenitorzellen und Astrozyten beschränkt. Allerdings lassen sich nicht alle astrozytären Zelllinien mit AAV9P1_gfaABC₁D-EYFP erfolgreich transduzieren.

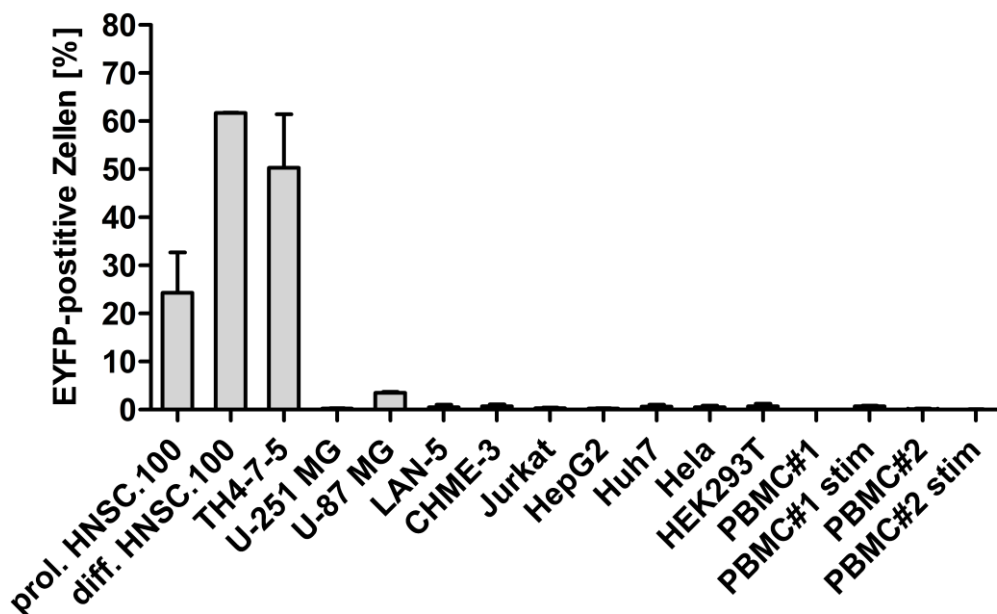


Abbildung 27: Transduktion verschiedener Zelltypen mit AAV9P1_gfaABC₁D-EYFP. Neuronale Progenitorzellen (prol. HNSC.100), Astrozyten (diff. HNSC.100, TH4-7-5, U-251 MG, U-87 MG), Neuronen (LAN-5), Mikroglia (CHME-3) T-Lymphozyten (Jurkat), Leberzellen (HepG2, Huh7), HEK293T und HeLa Zellen sowie PBMCs von zwei verschiedenen Spendern wurden mit AAV9P1_gfaABC₁D-EYFP transduziert (jeweils mit einer MOI von 1×10^5). 48 h nach der Transduktion wurden die Zellen mit Hilfe von

Durchflusszytometrie auf die Expression von EYFP untersucht. stim = stimuliert.

3.3 Analyse der Langzeit-Transduktion von HNSC.100 Zellen durch AAV9P1

Da es sich bei Astrozyten um langlebige Zellen handelt [62], ist es wichtig, dass ein viraler Vektor eine stabile Langzeit-Expression des Transgens ermöglicht. Mit den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob AAV9P1 dazu in der Lage ist.

HNSC.100 Zellen können sowohl als neurale Progenitorzellen, als auch als terminal differenzierte Astrozyten kultiviert werden (2.1.7). Während Progenitorzellen in der Lage sind regelmäßig zu proliferieren, zeichnen sich Astrozyten Kulturen durch eine terminale Differenzierung aus, was bedeutet, dass sie sich nicht mehr teilen können. Um diese Aussage zu bestätigen wurden sowohl prol. HNSC.100 als auch diff. HNSC.100 Zellen auf die Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 gefärbt (2.2.9). Ki-67 wird nur in Zellen exprimiert, die sich aktiv teilen und wird auch als Markerprotein in der Krebsdiagnostik verwendet [167].

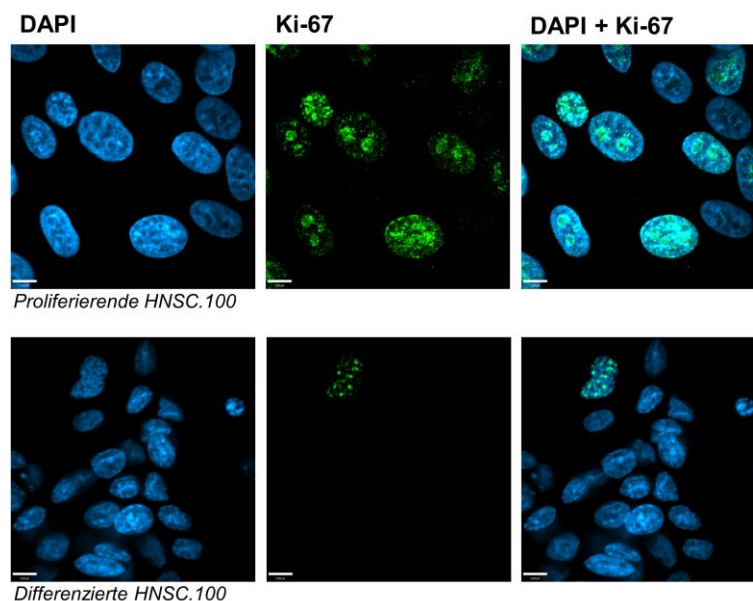


Abbildung 28: Analyse der Ki-67 Expression in HNSC.100 Kulturen. Prol. HNSC.100 Zellen (obere Reihe) und diff. HNSC.100 Zellen (untere Reihe) wurden auf die Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 gefärbt. Von jedem Zelltyp wurden 300 DAPI-gefärbte Zellkerne auf die Expression von Ki-67 ausgezählt. Prol. HNSC.100 zeigten dabei $86,7 \pm 6,4$ % Ki-67 positive Zellkerne, während es bei den diff. HNSC.100 Zellen $3,3 \pm 0,8$ % positive Kerne waren. Größenstandard = 7 μm .

In Abbildung 28 ist zu sehen, dass prol. HNSC.100 Zellen (obere Reihe) deutlich mehr Ki-67 positive Zellkerne aufweisen, als diff. HNSC.100 Zellen (untere Reihe). Von jedem Zelltyp wurden 300 DAPI-gefärbte Zellkerne auf die Expression von Ki-67 ausgezählt (2.2.11), wobei prol. HNSC.100 Zellen $86,7 \pm 6,4$ % positive Zellkerne aufwiesen, während diff. HNSC.100 Zellen nur $3,3 \pm 0,8$ % positive Zellkerne zeigten. Somit konnte bestätigt werden, dass diff. HNSC.100 terminal differenziert sind und sich nicht mehr teilen.

Um zu untersuchen, ob AAV9P1 in der Lage ist eine Langzeit-Transduktion in HNSC.100 Zellen zu vermitteln, wurden sowohl prol. HNSC.100 Zellen, als auch diff. HNSC.100 Zellen in 24-well Kulturschalen kultiviert und am Tag 0 mit einer MOI von $1 \cdot 10^5$ mit AAV9P1_CMV-EYFP transduziert (2.2.3, 2.2.5). Diff. HNSC.100 Zellen wurden zusätzlich noch mit AAV9P1_gfaABC₁D-EYFP transduziert. An unterschiedlichen Tagen nach der Transduktion wurden Zellen aus jeweils drei wells eines jeden Zelltyps geerntet (2.2.3). Die geernteten Zellen wurden für das Erstellen einer Wachstumskurve ausgezählt, es wurde genomische DNA isoliert (2.3.11) und Zellen wurden für Durchflusszytometrie (2.2.12) verwendet. Mit Hilfe der gDNA wurde die Anzahl an EYFP Transgenen pro Ansatz bestimmt (2.3.14) und mit der Durchflusszytometrie der Anteil an Zellen, der EYFP exprimieren.

Abbildung 29 zeigt die Ergebnisse des Langzeitversuchs für proliferierende HNSC.100 Zellen. Anhand der Wachstumskurve (Abbildung 29A) ist zu sehen, dass die Zellen sich kontinuierlich teilen, ab Tag 7 nach der Transduktion wurden die Zellen zweimal die Woche passagiert. Abbildung 29B zeigt die Anzahl an EYFP Transgenen. An Tag 1 nach der Transduktion ist, wie zu erwarten, eine hohe Anzahl an EYFP Transgenen in der Zellpopulation detektierbar. Diese nimmt im Verlauf des Experiments kontinuierlich ab bis ab Tag 24 nach der Transduktion keine Transgene mehr nachweisbar sind. Innerhalb der transduzierten prol. HNSC.100 Kultur kam es demnach zu einem stetigen Verlust an AAV9P1-vermittelten Transgenen. Abbildung 29C gibt den Prozentsatz an EYFP exprimierenden HNSC.100 Zellen an. Bereits ab Tag 1 nach der Transduktion sind $97,4 \pm 0,4$ % der Zellen EYFP positiv. Dieser hohe Prozentsatz bleibt, trotz bereits abnehmender Transgenzahlen (Abbildung 29B) bis Tag 4 konstant. An Tag 7 wurden die Zellen erstmals passagiert, gleichzeitig kommt es zu einer Abnahme der EYFP-positiven Zellen. Diese Abnahme setzt sich fort, bis ab Tag 14 nur noch Hintergrundsignale gemessen werden können. AAV9P1 ist demnach nicht in der Lage in prol. HNSC.100 Kulturen eine langanhaltende Transgenexpression zu vermitteln.

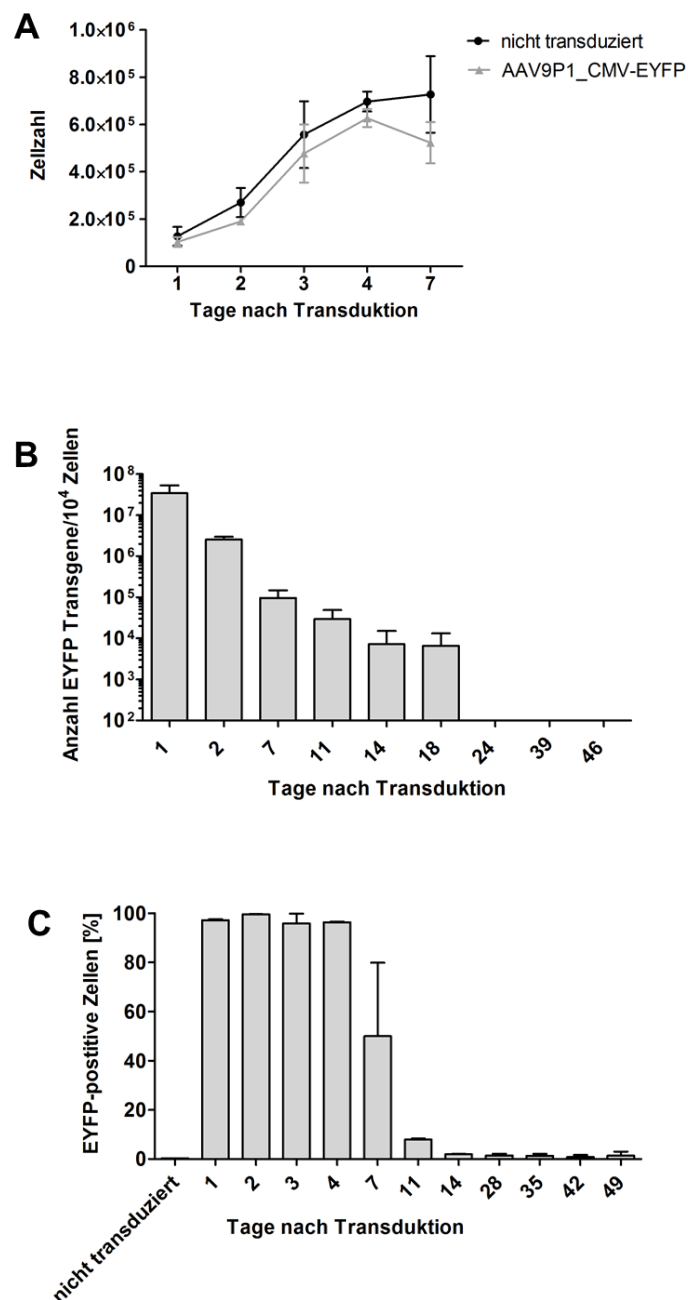


Abbildung 29: Langzeitanalyse des Transduktionsverhalten von AAV9P1 in proliferierenden HNSC.100 Kulturen. Proliferierende HNSC.100 Zellen wurden mit AAV9P1_CMV-EYFP transduziert und an verschiedenen Tagen nach der Transduktion geerntet. (A) Die geernteten Zellen wurden ausgezählt. Anhand der Wachstumskurve ist ersichtlich, dass die Zellen sich regelmäßig teilen. Die Zellen wurden ab Tag 7 zweimal wöchentlich passagiert. (B) Mittels qPCR wurde die Anzahl an EYFP Transgenen bestimmt, welche nach der Transduktion stetig abnimmt. (C) Mit Hilfe von Durchflusszytometrie wurde der Anteil an EYFP-positiven Zellen in der Population bestimmt. Nach einem ursprünglichen hohen Plateau nahm der Prozentsatz kontinuierlich ab.

Wie bei den prol. HNSC.100 wurden auch diff. HNSC.100 transduziert und im Anschluss an verschiedenen Tagen nach der Transduktion auf die Zellzahl, die Anzahl der EYFP Transgene und den Anteil an EYFP exprimierenden Zellen untersucht (Abbildung 30). Die erstellte Wachstumskurve (Abbildung 30A) zeigt, dass im Vergleich zu nicht transduzierten Zellen die beiden transduzierten Populationen keinen signifikanten Unterschied zeigen. Durch die Transduktion wird also über den gesamten Beobachtungszeitraum von 49 Tagen kein negativer oder toxischer Effekt sichtbar. In Abbildung 30B ist die Anzahl an EYFP Transgenen dargestellt. Wie auch bei den prol. HNSC.100 Zellen (Abbildung 29B) liegt an Tag 1 nach der Transduktion eine sehr hohe Anzahl an Transgenen vor. Ebenfalls wie bei den prol. HNSC.100 Zellen nimmt auch bei beiden transduzierten diff. HNSC.100 Populationen die Transgenzahl ab, allerdings ist auch an Tag 49 noch eine deutliche Transgenanzahl vorhanden. In Abbildung 30C ist der Anteil an EYFP exprimierenden Zellen sichtbar. Im Gegensatz zu prol. HNSC.100 Zellen ist das Maximum an EYFP positiven Zellen erst an Tag 4 nach der Transduktion erreicht, allerdings bleibt in beiden Ansätzen der Prozentsatz an EYFP positiven Zellen über den gesamten Experimentzeitraum auf einem gleich hohen Niveau. Sowohl die Transduktion mit AAV9P1_CMV-EYFP als auch mit AAV9P1_gfaABC₁D-EYFP führt in diff. HNSC.100 Kulturen zu einer Langzeit Transgenexpression.

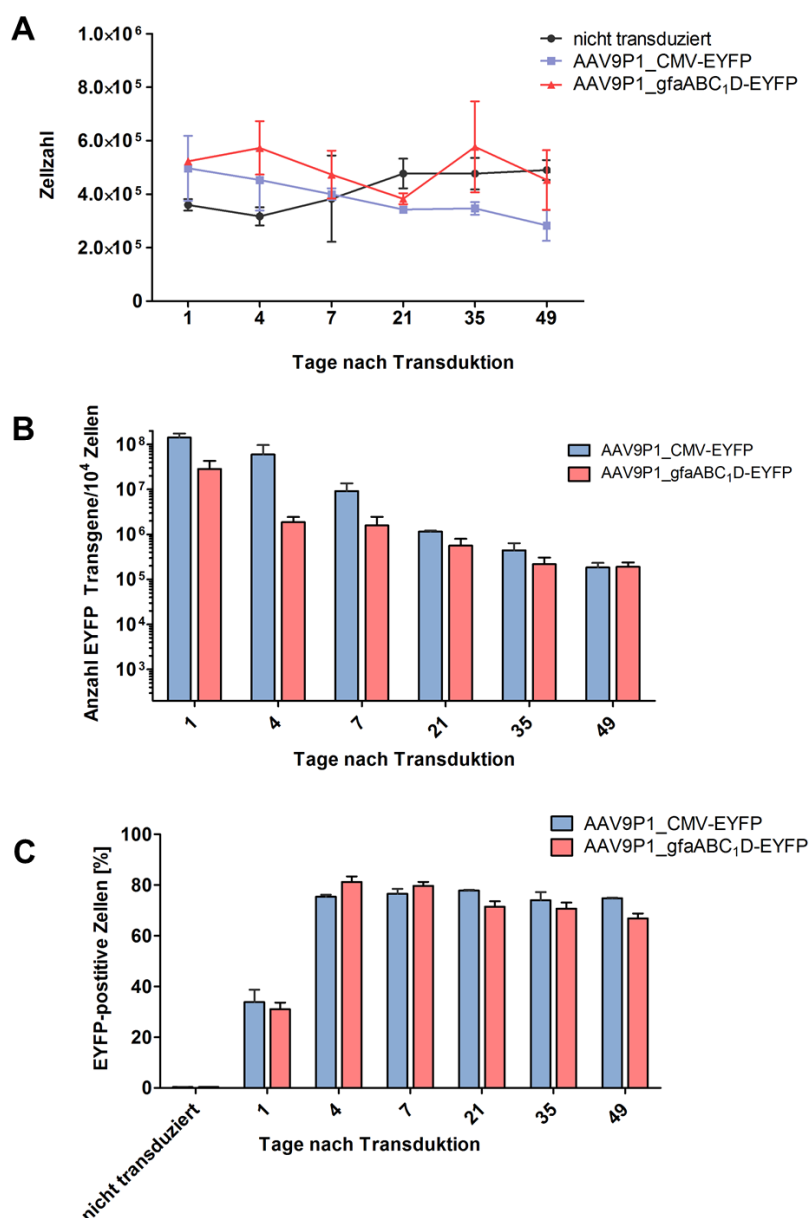


Abbildung 30: Langzeitanalyse des Transduktionsverhalten von AAV9P1 in differenzierten HNSC.100 Kulturen. Differenzierte HNSC.100 Zellen wurden sowohl mit AAV9P1_CMV-EYFP (blau) als auch mit AAV9P1_gfaABC₁D-EYFP (rot) transduziert. An verschiedenen Tagen nach der Transduktion wurden die Zellen geerntet. (A) Die erstellte Wachstumskurve zeigt, dass über den gesamten Verlauf des Experiments keine Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Populationen zu sehen sind. (B) Durch qPCR wurde die Anzahl an EYFP Transgenen bestimmt. Obwohl die Anzahl stetig abnimmt, lassen sich auch an Tag 49 nach der Transduktion in beiden Populationen noch Transgene nachweisen. (C) Der Prozentsatz an EYFP positiven Zellen wurde mit Hilfe von Durchflusszytometrie bestimmt. Das Maximum an EYFP positiven Zellen ist an Tag 4 nach der Transduktion erreicht und bleibt bis Tag 49 auf Werten über 70% .

3.4 Inhibierung der HIV Expression in persistent infizierten Astrozyten durch AAV9P1 vermittelte Transgene

HIV-1 infizierte Astrozyten bilden ein besonders herausforderndes Virus Reservoir, da sie nur unzureichend durch zugelassene cART Medikamente erreicht werden. Eine Alternative, um diesen Zelltyp zu erreichen, stellt der virale Vektor AAV9P1 dar. Aufgrund der zuvor beschriebenen Eigenschaften von AAV9P1 (spezifische Astrozyten Transduktion, Langzeit-Transgenexpression) soll mit den folgenden Experimenten festgestellt werden, ob AAV9P1 in der Lage ist HIV-1 inhibierende Sequenzen in persistent infizierte Astrozyten zu transportieren, um somit die HIV Expression zu inhibieren.

3.4.1 AAV9P1 vermittelte Überexpression des HIV Restriktionsfaktors 16.4.1

Das 16.4.1 Element aus der Fam21/Risp Proteinfamilie ist ein bereits beschriebener HIV Restriktionsfaktor in Astrozyten. Durch seine Interaktion mit den viralen Rev Protein verhindert 16.4.1 den Re-Import von Rev in den Zellkern. Dadurch werden späte HIV Transkripte nicht mehr effektiv in das Zytoplasma zur Translation transportiert, wodurch letztendlich die gesamte HIV Replikation inhibiert wird [83,84].

Um 16.4.1 in Astrozyten überzuexprimieren, wurde das Plasmid pBSU6_gfaABC₁D-16.4.1-EYFP (Tabelle 7) kloniert. Hierfür wurde zuerst die kodierende Sequenz für 16.4.1 in das pBSU6 Plasmid kloniert, es entstand das Plasmid pBSU6_16.4.1-EYFP. Um eine Astrozyten-spezifische Expression zu garantieren, wurde der CMV Promotor aus dem pBSU6_16.4.1-EYFP Plasmid durch den gfaABC₁D Promotor ersetzt, es entstand das Plasmid pBSU6_gfaABC₁D-16.4.1-EYFP (2.1.5). Mit Hilfe der Vektorplasmide pBSU6-gfaABC₁D-EYFP und pBSU6_gfaABC₁D-16.4.1-EYFP wurden AAV9P1 Vektoren hergestellt (2.2.6).

Als Zellsystem wurden TH4-7-5 Zellen (2.1.7) verwendet, da in diesem Zelltyp bereits gezeigt werden konnte, dass die Überexpression von Risp zu einer Abnahme der HIV Replikation führt (1.1.5.2). Diese vorangegangenen Experimente wurden durch die Transfektion von TH4-7-5 Zellen mit einem Risp-GFP kodierenden Plasmid erzielt [168]. In den folgenden Experimenten sollte gezeigt werden, dass auch eine AAV9P1-vermittelte Transduktion zu einer Überexpression von Risp in TH4-7-5 Zellen führen kann. TH4-7-5 Zellen wurden mit den AAV9P1 Vektoren transduziert (MOI $1 \cdot 10^5$; 2.2.5) und 72 h nach der Transduktion wurden die Gag-p24 Mengen der einzelnen Kulturen bestimmt. Gag-p24 Mengen wurden intrazellulär und im Überstand gemessen (2.2.8).

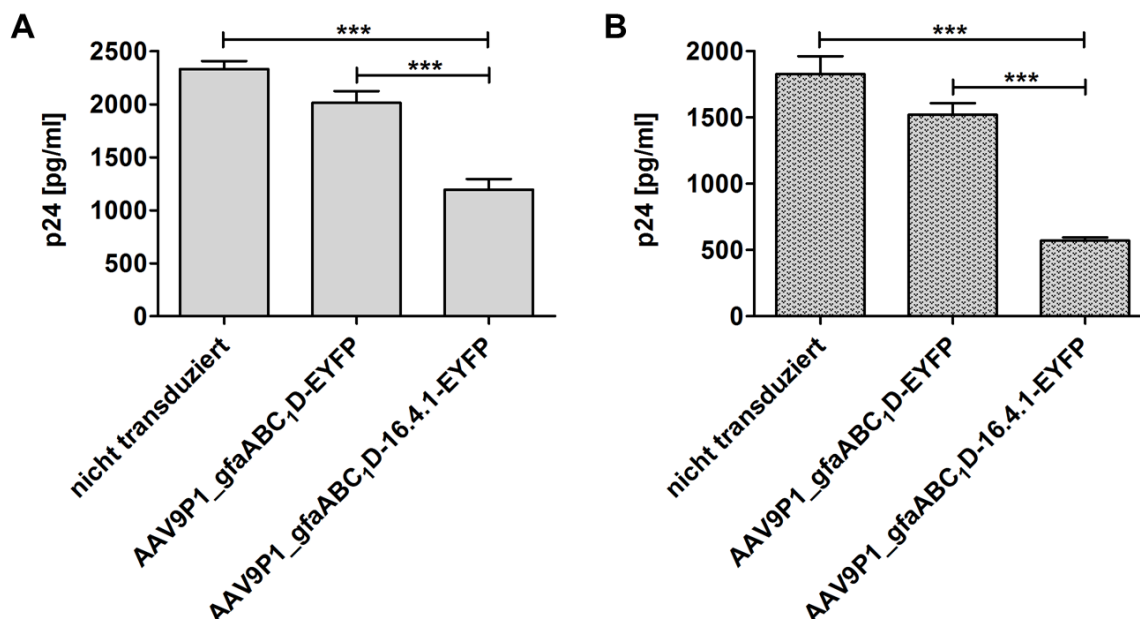


Abbildung 31: Transduktion von TH4-7-5 mit AAV9P1_gfaABC₁D-EYFP und AAV9P1_gfaABC₁D-16.4.1-EYFP (MOI 1*10⁵). 72 h nach der Transduktion wurden Gag-p24 Mengen im Zellkulturüberstand (A) und intrazellulär (B) mit Hilfe eines ELISA gemessen. In beiden Fällen sind die Gag-p24 Level bei einer Überexpression von 16.4.1 im Vergleich zu nicht transduzierten Zellen und EYFP-exprimierenden Zellen signifikant erniedrigt. Zwischen nicht transduzierten Zellen und EYFP-exprimierenden Zellen bestand kein signifikanter Unterschied. ***p ≤ 0,001.

In Abbildung 31 sind die Ergebnisse der Gag-p24 Quantifizierung zu sehen, wobei Abbildung 31A Gag-p24 Level im Zellkulturüberstand (extrazellulär) und Abbildung 31B intrazelluläre Gag-p24 Level zeigt. In beiden Fällen besteht kein signifikanter Unterschied zwischen nicht transduzierten Zellen und Zellen, die mit AAV9P1_gfaABC₁D-EYFP transduziert wurden und somit lediglich EYFP exprimieren. Sobald die Zellen das Fusionsprotein 16.4.1-EYFP exprimieren, nimmt die Gag-p24 Menge im Vergleich zu den beiden Negativkontrollen signifikant ab. Dieser Effekt kann sowohl auf extrazelluläre Gag-p24 Mengen, als auch auf intrazelluläre Gag-p24 Mengen beobachtet werden. Die Überexpression von 16.4.1 führt allerdings nicht zu einer vollständigen Inhibierung der Gag-p24 Expression.

3.4.2 Inhibierung der HIV Expression durch den Einsatz von CRISPR/Cas9

Da persistent infizierte Astrozyten ein integriertes HIV Provirus beherbergen, wäre es der direkteste Weg die HIV-Expression in diesen Zellen zu inhibieren, wenn die Inaktivierung des Provirus über Genom-Editierungssysteme erfolgt. Die Einführung des CRISPR/Cas9 Systems hat die Möglichkeiten der Genom-Editierung, um ein Vielfaches erweitert und

gleichzeitig im Vergleich zu bestehenden Systemen deutlich vereinfacht (1.3). In den folgenden Versuchen wird die Etablierung eines CRISPR/Cas9 Systems, welches durch AAV9P1 in persistent infizierte Astrozyten eingebracht wird, dargestellt.

3.4.2.1 Guide RNA Design und Klonierung verschiedener CRISPR/Cas9 Konstrukte

Das CRISPR/Cas9 System besteht neben der Nuklease Cas9 aus einer gRNA. Ein Teil dieser gRNA ist ein 20 nt langer Abschnitt, welcher komplementär zur gewünschten Ziel-DNA entworfen wird und Cas9 letztendlich zur Ziel-DNA führt (1.3). Sämtliche gRNAs in dieser Arbeit wurden mit dem Online-Tool von <http://www.genome-engineering.org> entworfen, welches auf dem Paper Hsu *et al.*, 2013 beruht [127]. Für die Auswahl von möglichen HIV-spezifischen gRNAs wurden die LTR Sequenzen sowohl vom HIV-Laborstamm NL4-3 als auch vom Laborstamm LAI in das Online-Tool geladen. Aus den resultierenden gRNAs wurden 6 gRNAs ausgesucht, welche folgende Eigenschaften gemeinsam hatten: 1. Die gRNA bindet in LTR Sequenzen beider HIV Stämme, 2. Die gRNA bindet an oder in der Nähe von Bindestellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren. Die resultierenden gRNAs sind in Tabelle 21 aufgelistet.

Tabelle 21 zeigt, an welchen Stellen der proviralen Sequenzen die gRNAs genau binden. So binden alle gRNAs sowohl im 5' LTR als auch im 3' LTR, außer gRNA2 und gRNA6, welche nur im 5' LTR binden. Zudem wurde untersucht in welchen HIV-1 Subtypen (1.1.1) die gRNAs binden. Die gRNAs 1, 3, 4, 5 binden in den Subtypen A, B, C und D. Guide RNA 2 bindet in den Subtypen A, B und D, während gRNA6 lediglich im Subtyp B bindet. Der HIV Subtyp C ist der am weitesten verbreitete weltweit, die Subtypen A, B, C und D machen zusammengerechnet 73% der weltweiten HIV Infektionen aus [12].

Ein wichtiger Punkt im Zusammenhang mit dem Design von gRNAs ist die Frage nach möglichen Off-Targets, also die Frage wie wahrscheinlich eine gRNA an eine andere DNA-Sequenz als die eigentlich geplante bindet. Sämtliche gRNAs wurden mitsamt ihrem zugehörigen PAM (1.3) mit zwei verschiedenen Datenbanken gegen das gesamte humane Genom (GRCh38) abgeglichen. Keine der gRNAs ergab hierbei einen Treffer im humanen Genom. Zusätzlich wurden die Off-Target Scores für jede gRNA mit dem Online-Tool basierend auf Hsu *et al.*, 2013 [127] berechnet. Laut dem Online-Tool werden gRNAs mit einem Wert über 50 als „high quality“ gRNAs eingestuft, was bedeutet, dass es eine sehr geringe Wahrscheinlichkeit für Off-Target Effekte gibt. Guide RNAs 1, 5 und 6 erfüllen dieses Kriterium. Guide RNA 3 liegt mit einem Wert von 47 knapp darunter, bei den gRNAs 2 und 4 wird das Kriterium nicht erfüllt.

Die gRNA Luc wurde als Negativkontrolle für folgende Experimente entworfen und bindet innerhalb der Renilla Luciferase.

Tabelle 21: Sämtliche gRNAs sind zusammen mit der Sequenz in 5'→3' Richtung aufgelistet. Zusätzlich zeigt die Tabelle wo die genauen Bindestellen der gRNAs innerhalb von NL4-3 und LAI sind und welche HIV-1 Subtypen von den gRNAs erkannt werden. Alle gRNAs wurden mit Hilfe der BLAT und der BLAST Datenbank gegen das humane Genom (GRCh38) abgeglichen. Der Off-Target Score für jede gRNA wurde basierend auf Hsu *et al.*, 2013 [127] berechnet. Luc ist eine gRNA gegen Renilla Luciferase und dient als Negativkontrolle.

gRNA Nummer	Sequenz 5' → 3'	Bindestelle in proviralen Sequenzen von NL4-3, LAI	gRNA bindet HIV-1 Subtypen*	Treffer in BLAT Datenbank [#]	Treffer in BLAST Datenbank [^]	Score [/]
1	GTA CTC CGG ATG CAG CTC TC	298-317; 9403-9422 298-317; 940-9449	A, B, C, D	-	-	79
2	GGG GAC TTT CCA GGG AGG TG	363-382 363-382	A, B, D	-	-	28
3	GCC ACT CCC CAG TCC CGC CC	389-408; 9494-9513 389-408; 9521-9540	A, B, C, D	-	-	47
4	GCC TGG GCG GGA CTG GGG AG	385-404; 9490-9509 385-404; 9517-9536	A, B, C, D	-	-	27
5	AGC TGC TTT TTG CCT GTA CT	434-453; 9539-9558 434-453; 9566-9585	A, B, C, D	-	-	64
6	ACG CCA AAA ATT TTG ACT AG	750-769 750-769	B	-	-	72
Luc	GAT AAC TGG TCC GCA GTG GT	-	-	-	-	86

*gRNAs wurden gegen Sequenzen verschiedener HIV Stämme abgeglichen; HIV Datenbank – Los Alamos National Laboratory (www.hiv.lanl.gov)

[#]gRNAs (+PAM) wurden mit Hilfe der BLAT Datenbank gegen das gesamte humane Genom abgeglichen; USCS Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu>); Treffer = 100% Übereinstimmung von gRNA mit humanem Genom.

[^]gRNAs (+PAM) wurden mit Hilfe der BLAST Datenbank gegen das gesamte humane Genom abgeglichen; NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>); Treffer = 100 % Übereinstimmung von gRNA mit humanem Genom.

[/]Scores für off-target Wahrscheinlichkeiten der gRNAs wurden mit dem Online-Tool basierend auf Hsu *et al.*, 2013 [127] berechnet. Werte reichen von 0 bis 100, wobei die Wahrscheinlichkeit für Off-Target Effekte ab einem Wert von 50 als unwahrscheinlich eingestuft wird.

Eine Übersicht der Bindestellen der gRNAs ist in Abbildung 32 zusehen. Während gRNA1 in der Nähe der wichtigen NF- κ B Bindestellen bindet, liegen gRNA 2, 3 und 4 in der Binderegion für den Transkriptionsfaktor SP1. Guide RNA5 hingegen ist direkt am Transkriptionsstart gelegen. Guide RNA 6 bindet an die Hauptspleißdonorstelle, von der eine Vielzahl an HIV Transkripten gespleißt wird (1.1.2.1).

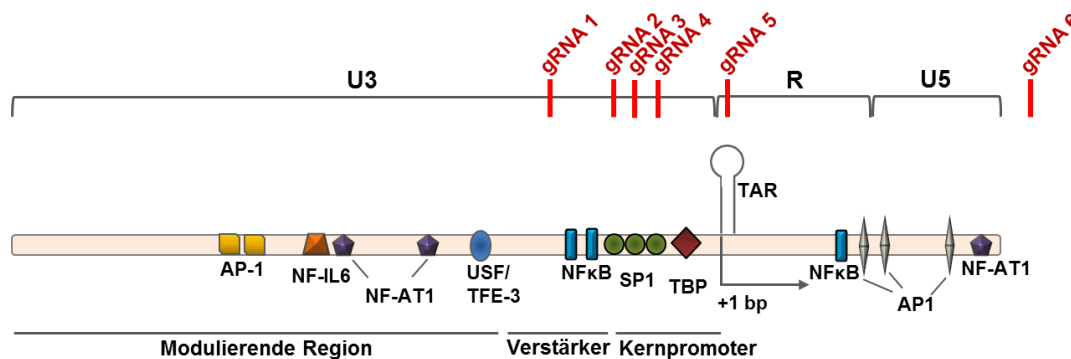


Abbildung 32: Schema des HIV 5' LTRs. Eine genaue Beschreibung der LTR Elemente ist in der Einleitung zu finden (1.1.2.1). Die Lokalisation der gRNAs ist in rot dargestellt. Alle gRNAs wurden so entworfen, dass sie an oder in der Nähe von wichtigen Transkriptionsfaktor Bindestellen gelegen sind, gRNA5 liegt direkt am Transkriptionsstart, während gRNA6 an der Hauptspleißdonorstelle bindet.

Um die gRNAs 1-6 in einen AAV Kontext zu bringen, wurden sie in eine Plasmid Tool-Box kloniert, welche in Senís *et al.*, 2014 beschrieben wurde [142]. Die Plasmide basieren alle auf dem pSSV9 Plasmid (2.1.5). Die Plasmide werden als „all-in-one“ Konstrukte bezeichnet, da sie sowohl eine Expressionskassette für Cas9 als auch eine für die Expression der gRNA besitzen. Die Plasmide unterscheiden sich lediglich in dem verwendeten Pol III Promotor, der die Expression der gRNA steuert. Eine genaue Beschreibung der pSSV9-basierten all-in-one Plasmide (pSSV9_shortCMV_Cas9_H1gRNA, pSSV9_shortCMV_Cas9_U6gRNA, pSSV9_shortCMV_Cas9_7SKgRNA) ist unter Abschnitt 2.1.5 zu finden. Alle 6 gRNAs wurden in alle 3 beschriebenen Plasmide kloniert, wodurch 18 verschiedene CRISPR/Cas9 Konstrukte (Tabelle 7) entstanden, die auf ihre Fähigkeit die HIV Expression zu inhibieren getestet wurden.

3.4.2.2 Etablierung eines gRNA Screening Systems

Um aus den 18 CRISPR/Cas9 Konstrukten die gRNA Promotor Kombinationen herauszufinden, die am effektivsten die Expression von HIV inhibieren, wurde ein Screening System etabliert (2.2.7). Mit Hilfe dieses Screening Systems ist es möglich schnell und

reproduzierbar den Effekt einer gRNA auf die HIV Expression zu untersuchen. Bevor jedoch alle 18 Konstrukte getestet wurden, wurde mit einem gRNA Konstrukt die Effektivität des Screenings getestet. Hierfür wurde ein all-in-one Konstrukt, welches gRNA5 unter der Kontrolle des U6 Promotors exprimiert, ausgewählt. Der Ablauf des Vortests ist in Abbildung 33 zu sehen.

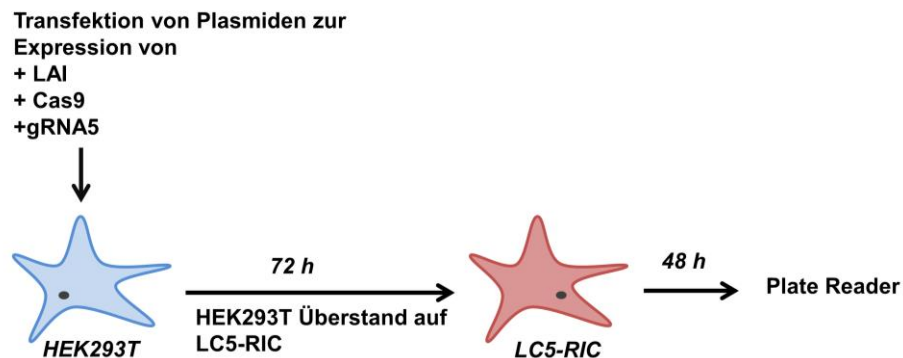


Abbildung 33: Test des gRNA Screening Systems. An Tag 1 werden HEK293T Zellen mit Plasmiden zur Expression von LAI, Cas9 und gRNA5 transfiziert. 72 h nach der Transfektion wurde ein Aliquot des HEK293T Überstandes auf die HIV Reporterzelllinie LC5-RIC übertragen. Nach einer HIV Infektion exprimieren LC5-RIC einen dsRed Reporter. 48 h nach dem Übertrag des HEK293T Überstandes wurden die LC5-RIC Zellen mittels Plate Reader, Durchflusszytometrie und Mikroskop auf die Expression von dsRed untersucht.

An Tag 1 wurden HEK293T Zellen mit dem Plasmid pLAI.2 und pSSV9_shortCMV_Cas9_7SKgRNA5 (2.1.5) ko-transfiziert. Nach 72 h Stunden wird der Überstand der HEK293T, welcher nun HIV Partikel (LAI) enthält auf die Reporterzelllinie LC5-RIC gegeben. LC5-RIC Zellen enthalten einen durch HIV induzierbaren dsRed Reporter (2.1.7). 48 h nach dem Übertrag des HEK293T Überstandes wurden die LC5-RIC Zellen auf die Expression des dsRed Reporters analysiert (Plate Reader, Durchflusszytometrie, Mikroskop).

Abbildung 34 zeigt die Ergebnisse der Plate Reader (A) und Durchflusszytometrie (B) Analyse. Mock bedeutet, dass die HEK293T mit einem leeren pUC18 Plasmid transfiziert wurden, bzw. mit pUC18 und pSSV9_shortCMV-Cas9 ko-transfiziert wurden (mock+Cas9). In diesen Negativkontrollen wurde kein LAI produziert, weswegen die LC5-RIC Zellen sowohl im Plate Reader als auch bei der Durchflusszytometrie kein Signal zeigen. Als Positivkontrolle dienten HEK293T Zellen, die nur mit dem pLAI.2 Plasmid (LAI) transfiziert wurden oder die mit pLAI.2 und pSSV9_shortCMV-Cas9 (LAI+Cas9) ko-transfiziert wurden.

Sowohl die LAI als auch die LAI + Cas9 LC5-RIC Kulturen zeigen eine hohe Expression an dsRed. Bei der Durchflusszytometrie liegen LAI LC5-RIC Kulturen bei $68,5 \pm 8,0\%$ und LAI + Cas9 Kulturen liegen bei $73,2 \pm 7,8\%$ dsRed positiven Zellen. HEK293T, die mit pLAI.2 und dem CRISPR/Cas9 (LAI + Cas9/gRNA5) Konstrukt ko-transfiziert wurden, produzierten weniger LAI Partikel, welche zu einem stark verringerten dsRed Signal in LC5-RIC Zellen führten ($6,9 \pm 3,0\%$ dsRed positive Zellen).

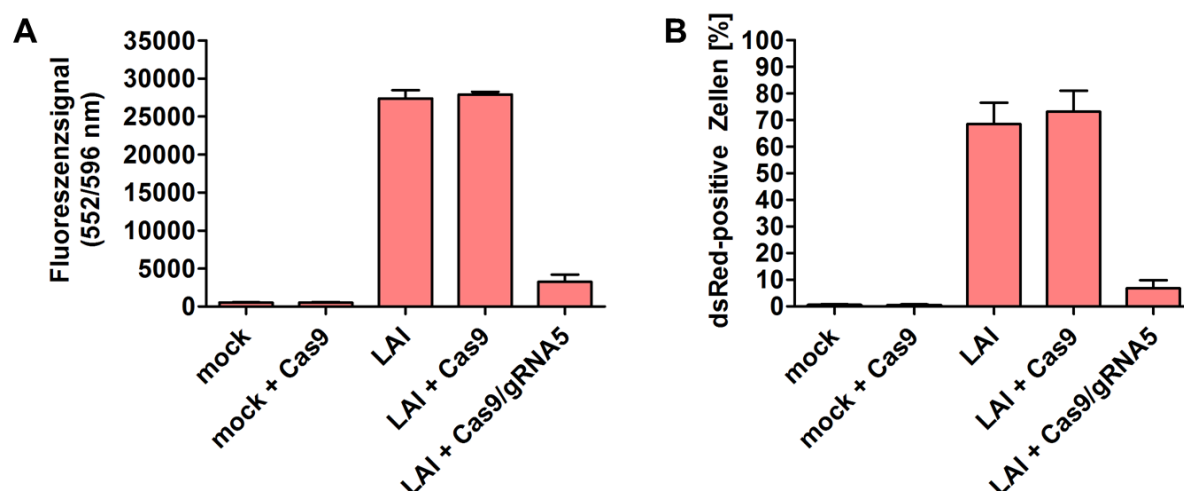


Abbildung 34: Analyse des dsRed Signals in LC5-RIC Kulturen. LC5-RIC Zellen wurden auf die Expression von dsRed untersucht. (A) Mit Hilfe eines Plate Readers wurde das dsRed Signal bei einer Anregung von 552 nm und einer Emission von 596 nm gemessen. (B) Der Prozentsatz an dsRed positiven Zellen wurde mit Hilfe von Durchflusszytometrie analysiert. In beiden Fällen zeigt die Inkubation von LC5-RIC Zellen mit LAI+Cas9/gRNA5 Überständen eine Reduktion des dsRed Signals im Vergleich zu den Positivkontrollen (LAI, LAI+Cas9).

Abbildung 35 zeigt, dass LC5-RIC Zellen, die mit mock HEK293T Überständen behandelt wurden und somit nicht infiziert sind, kein dsRed Signal zeigen. LC5-RIC Zellen, die mit LAI Partikeln aus HEK293T Überständen infiziert wurden, zeigen eine hohe Anzahl an dsRed positiven Zellen. Sobald HEK293T Kulturen sowohl mit pLAI.2 als auch mit dem Cas9/gRNA5 Konstrukt transfiziert wurden, wurde die HIV Expression bzw. Replikation inhibiert. Dies hatte zur Folge, dass eine geringere Anzahl an LC5-RIC Zellen den HIV induzierbaren dsRed Reporter exprimieren.

Aus dem Vortest geht hervor, dass sich das Screening System gut zur Identifizierung von potenten CRISPR/Cas9 Konstrukten eignet. Für den weiteren Verlauf des Screenings wurde eine Auswertung der dsRed Expression mittels Plate Reader als ausreichend betrachtet.

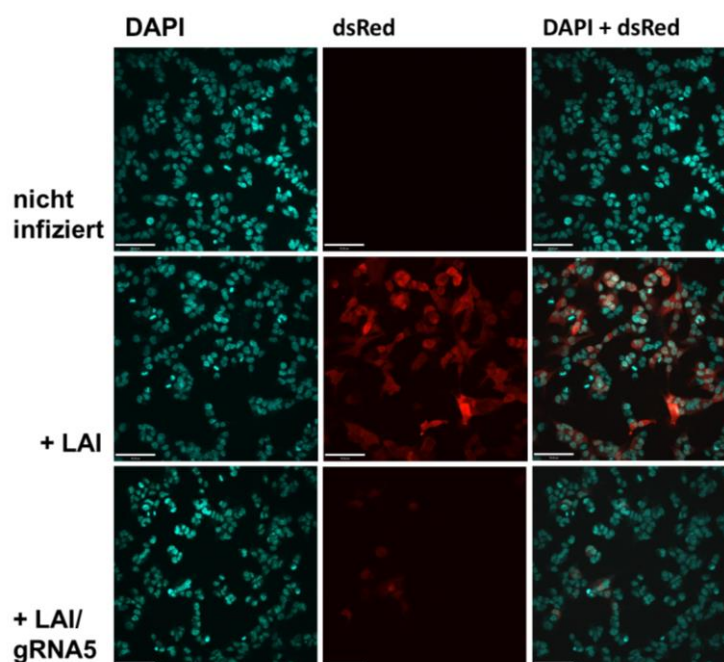


Abbildung 35: Mikroskopieanalyse der dsRed Expression in LC5-RIC Kulturen. LC5-RIC Zellen wurden mit unterschiedlichen HEK293T Überständen behandelt. Nicht infiziert = LC5-RIC Zellen, die mit mock transfizierten HEK293T Überständen behandelt wurden; LAI = LC5-RIC wurden mit LAI haltigen Überständen behandelt. LAI/gRNA5 = LC5-RIC Zellen wurden mit Überständen von pLAI.2 und Cas9/gRNA5 Konstrukt ko-transfizierten HEK293T Überständen behandelt. In Anwesenheit eines funktionsfähigen CRISPR/Cas9 Systems wurde die HIV Expression inhibiert, was sich in der verringerten Anzahl an dsRed positiven Zellen zeigt (unterste Reihe). Die Zellkerne wurden mittels DAPI angefärbt. Größenstandard = 70 µm.

3.4.2.3 Identifizierung von potenten Promotor-gRNA Kombinationen

Nachdem das Screening Verfahren, wie im Abschnitt 3.4.2.2 beschrieben, erfolgreich getestet wurde, wurden die 18 verschiedenen CRISPR/Cas9 Konstrukte auf ihre Fähigkeit die HIV Expression zu inhibieren getestet. Der genaue Ablauf des Screenings und die Auswertung der Daten ist im Abschnitt 2.2.7 erklärt.

Abbildung 36 zeigt die Ergebnisse des gRNA Screenings. Die Ergebnisse wurden nach der Verwendung der verschiedenen Pol III Promotoren für die Expression der gRNA aufgeteilt, so sind in Abbildung 36A die Ergebnisse mit dem H1 Promotor, in Abbildung 36B mit dem U6 Promotor und in Abbildung 36C mit dem 7SK Promotor dargestellt. In allen drei Graphen stellen die mock Kulturen Negativkontrollen dar, welche anstatt mit pLAI.2 mit dem leeren pUC18 Plasmid transfiziert wurden. Somit konnte gezeigt werden, dass die alleinige Expression von Cas9, einer gRNA oder eines all-in-one Konstrukts keinen Einfluss auf die dsRed Reporter Expression hatte. Als Positivkontrollen dienten in allen drei Graphen LAI

Kulturen, hierbei wurden die LC5-RIC Zellen mit Überständen behandelt, die von HEK293T Zellen stammen, welche nur HIV exprimieren. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die alleinige Expression von Cas9 (LAI+Cas9) oder einer gRNA (LAI+gRNA) keinen Einfluss auf die HIV Expression hat. Auch ein vollständiges CRISPR/Cas9 System, bestehend aus Cas9 und einer gRNA gegen die Renilla Luciferase (LAI+Luc), zeigt keinen Einfluss auf die HIV Expression und somit auch nicht auf die Expression des dsRed Reporters.

Abbildung 36A zeigt die Ergebnisse für die gRNA Expression unter der Kontrolle des H1 Promotors. Mit $18,3 \pm 8,4\%$ infizierter Zellen zeigt gRNA3 im all-in-one Kontext die stärkste Reduktion im Vergleich zu LAI Kulturen, gefolgt von gRNA4 mit $40,7 \pm 11,5\%$ dsRed positiven Zellen. Keine eindeutige Reduktion an infizierten Zellen ist bei den gRNAs2 ($80,1 \pm 11,9\%$) und 6 ($92,8 \pm 7,3\%$) zu beobachten.

In Abbildung 36B sind die Ergebnisse mit den Konstrukten zu sehen, die den U6 Promotor nutzen. Die gRNAs 1, 3 und 5 zeigen die stärksten Reduktionen mit je $11,7 \pm 5,4\%$, $18,4 \pm 8,8\%$ und $5,9 \pm 1,0\%$ dsRed positiven Zellen. Erneut ist bei den gRNAs 2 ($80,2 \pm 11,9\%$) und 6 ($92,8 \pm 7,3\%$) keine eindeutige Reduktion des dsRed Signals zu sehen.

Die Ergebnisse des gRNA Screenings, bei dem der 7SK Promotor (Abbildung 36C) die Expression der gRNA antreibt, gleichen den U6 Promotor Ergebnissen aus Abbildung 36B. Die all-in-one Konstrukte mit den gRNAs 5, 4, und 3 zeigen eine Reduktion auf $8,5 \pm 2,2\%$, $16,1 \pm 9,4\%$ und $18,3 \pm 5,1\%$. Wie auch zuvor zeigen gRNA2 ($69,1 \pm 23,2\%$) und 6 ($103,4 \pm 5,2\%$) keine Reduktion des dsRed Signals und haben dementsprechend keinen Einfluss auf die HIV Expression.

Aus dem Screening geht hervor, dass H1 Promotor Konstrukte den insgesamt schwächsten Effekt auf die HIV Expression zeigen. Unter den U6 und 7SK Promotor Konstrukten sind die gRNAs1, 3 und 5 am effektivsten in der HIV Inhibierung. Aufgrund der guten Off-Target Werte von gRNA1 und 5 (3.4.2.1) und der Fähigkeit der beiden gRNAs die HIV Expression stark zu hemmen, wird im folgenden Verlauf der Arbeit mit diesen beiden gRNAs gearbeitet. Für alle weiteren Experimente wurden die all-in-one Konstrukte verwendet, die die gRNAs1 und 5 unter der Kontrolle des 7SK Promotors exprimieren (pSSV9_shortCMV_Cas9_7SKgRNA1 und pSSV9_shortCMV_Cas9_7SKgRNA5; 2.1.5).

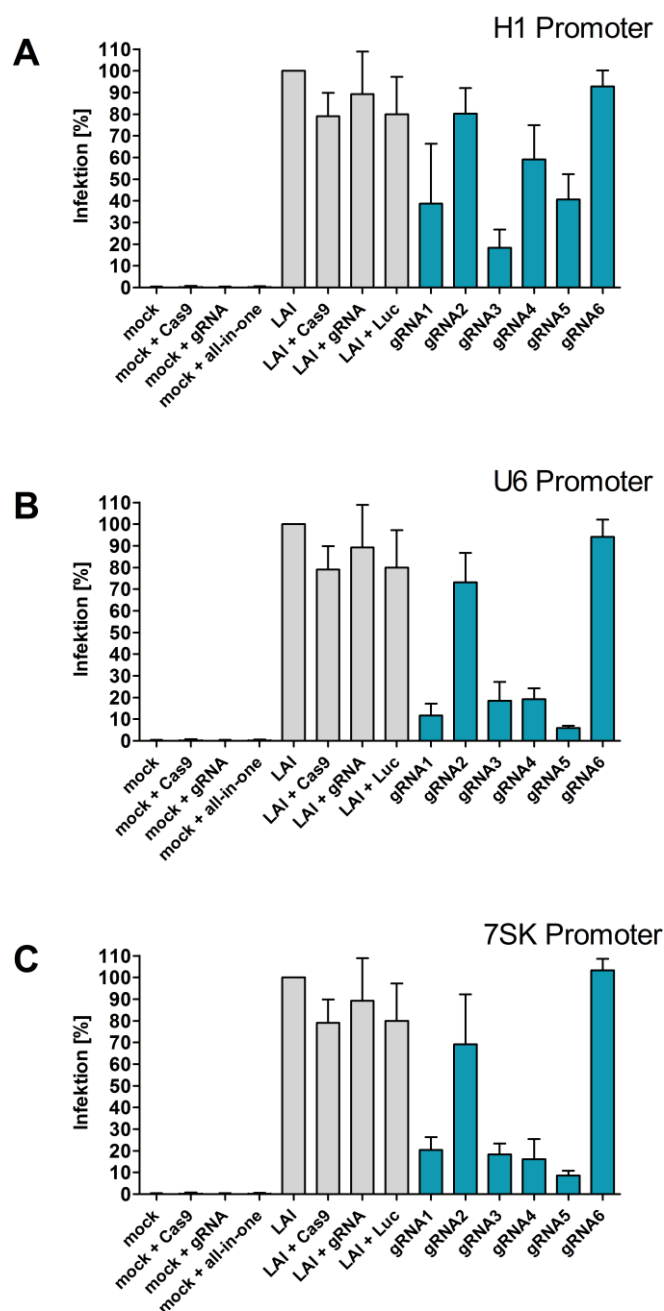


Abbildung 36: Ergebnisse des gRNA Screenings. Alle 18 CRISPR/Cas9 Konstrukte, die gegen den HIV LTR gerichtet sind, wurden auf ihre Fähigkeit die HIV Expression zu inhibieren getestet. Der genaue Ablauf des Screenings ist in Abschnitt 2.2.7 erläutert. Als Negativkontrollen dienten mock Kulturen, welche kein HIV produzierten. Als Positivkontrollen dienten LAI Kulturen (grau), welche zwar HIV aber entweder kein funktionsfähiges CRISPR/Cas9 System oder eines gegen Renilla Luciferase exprimieren. Die Ergebnisse wurden nach den Pol III Promotoren, welche die gRNA Expression antreiben, aufgeteilt. (A) H1 Promotor, (B) U6 Promotor und (C) 7SK Promotor. Die Zahlen 1-6 zeigen die jeweils verwendeten gRNAs an.

Da CRISPR/Cas9 ein Genomeditierungssystem darstellt, wurde im Anschluss an die Identifizierung potenter gRNAs, der Einfluss des CRISPR/Cas9 Systems auf den HIV Provirus untersucht. Hierfür wurden HEK293T in 12-well Zellkulturschalen ausgesät (2.2.2) und mit pLAI.2 in Kombination mit einer/beiden der oben identifizierten all-in-one Konstrukten oder mit dem all-in-one Luc Konstrukt transfiziert (2.2.4; je 500 ng von jedem Plasmid). 72 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet (2.2.2), es wurde gDNA isoliert (2.3.11) und ein T7 Assay wurde durchgeführt (2.3.10), um nachzuweisen, ob CRISPR/Cas9 zu Mutationen im HIV Provirus geführt hat. Welche Art von Mutationen aufgetreten sind, wurde im Anschluss mittels einer MiSeq Sequenzierung (2.3.15) analysiert. Die Abbildung 37A zeigt die Ergebnisse des T7 Assays. Bei diesem Assay werden die Bereiche der DNA, welche von CRISPR/Cas9 mutiert wurden mittels PCR amplifiziert. Im Anschluss werden die PCR Produkte denaturiert und es wird ihnen ermöglicht sich wieder zu hybridisieren. Bei dem Hybridisierungsschritt können sich nun Wildtyp Einzelstränge auch mit mutierten Einzelsträngen zusammenlagern, es entstehen Heterodimere. Durch einen Verdau der PCR Produkte mit der T7 Endonuklease, welche nur Heterodimere schneidet, ergeben sich für mutierte Bereiche, die Heterodimere gebildet haben, Verdauprodukte. Diese Verdauprodukte sind in Form von Banden auf einem Agarosegel sichtbar gemacht worden. DNA Abschnitte, welche nicht durch CRISPR/Cas9 mutiert wurden, bilden nach dem Denaturierungs/Hybridisierungsschritt nur Homodimere und es kommt zu keinem T7 Verdau. Bei HEK293T Kulturen (Abbildung 37A), die entweder mit pLAI.2 (LAI) oder mit pLAI.2 und dem Luc all-in-one Konstrukt (LAI+Luc) transfiziert wurden, ist lediglich die Bande des PCR Produkts (1000 bp), aber keine Verdauprodukte, zu sehen. HEK293T Kulturen, die mit pLAI.2 und einem oder beiden all-in-one Konstrukten transfiziert wurden, zeigen hingegen neben der Bande für das PCR Produkte, Banden, die aus dem Verdau mit der T7 Endonuklease hervorgegangen sind (Pfeile). Somit konnte gezeigt werden, dass CRISPR/Cas9 verschiedene Mutationen innerhalb des HIV Provirus hervorruft.

Abbildung 37B bestätigt, dass CRISPR/Cas9 Mutationen im HIV Provirus hervorgerufen hat und zeigt zudem, welche Mutationen entstanden sind. Im Vergleich zu den LAI Wildtyp Sequenzen, zeigen sich keine Mutationen, wenn die Zellen mit dem Luc all-in-one Konstrukt transfiziert wurden. Wurden HEK293T Kulturen mit einer der beiden gRNAs transfiziert sind unterschiedliche Mutationen aufgetreten. In beiden Fällen können kurze Deletionen beobachtet werden, aber auch Insertionen bzw. Punktmutationen sind aufgetreten. In Kulturen, die beide gRNAs exprimieren, lassen sich ausschließlich weitläufige Deletionen, die den gesamten Bereich zwischen den beiden gRNA Bindestellen einschließen, detektieren. Da beide gRNAs an für die HIV Expression wichtige LTR Sequenzen binden, erklären diese Mutationen die starken Effekte auf die HIV Expression aus Abbildung 36C.

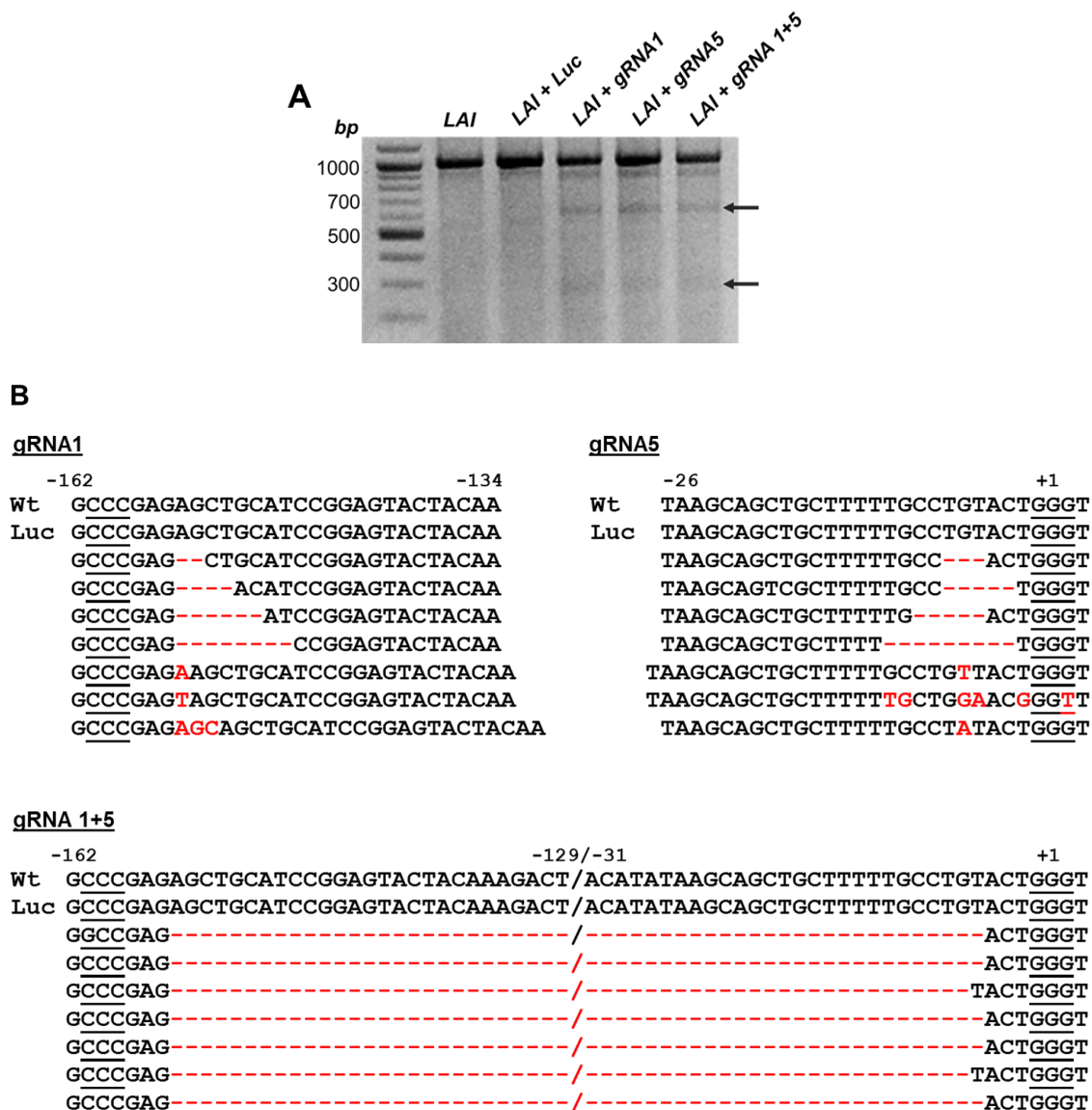


Abbildung 37: Analyse der durch CRISPR/Cas9 hervorgerufenen Provirusmutationen in HEK293T Kulturen. HEK293T Kulturen wurden mit pLAI.2 und einem bzw. beiden all-in-one Konstrukten aus Abbildung 36C (gRNA1, 5) transfiziert. Als Negativkontrolle wurden Zellen mit pLAI.2 und dem Luc all-in-one Konstrukt transfiziert. (A) Ergebnisse aus einem T7 Assay zeigen, dass nur Kulturen, die mit pLAI.2 und den gRNA Konstrukten transfiziert wurden, Verdauungsprodukte und somit Mutationen im HIV Provirus zeigen (Pfeile). (B) MiSeq Ergebnisse zeigen die verschiedenen Mutationen, die durch CRISPR/Cas9 im HIV Provirus hervorgerufen wurden.

3.4.2.4 Effekte auf HIV-1 Expression in HNSC.LatGFP1.2 Kulturen nach der Transduktion mit AAV9P1 CRISPR/Cas9

Die im Abschnitt 3.4.2.3 identifizierten CRISPR/Cas9 Konstrukte pSSV9_shortCMV_Cas9_7SKgRNA1 und pSSV9_shortCMV_Cas9_7SKgRNA5 wurden im Anschluss benutzt um AAV9P1 Vektoren herzustellen (2.2.6). Die entstandenen Vektoren enthalten kodierende Sequenzen für Cas9 und die entsprechende gRNA, welche unter der Kontrolle des 7SK Promotors exprimiert wird. Im weiteren Verlauf der Arbeit werden die Vektoren als AAV9P1_gRNA1 oder AAV9P1_gRNA5 bezeichnet.

Um zu testen, ob eine durch AAV9P1 vermittelte Transduktion von CRISPR/Cas9 zu einer Inhibierung der HIV Expression führt, wurden HNSC.LatGFP1.2 Zellen (2.1.7) in 48-well Zellkulturschalen zu Astrozyten-angereicherten Kulturen differenziert (2.2.3). Nach der Differenzierung wurden die Zellen mit AAV9P1_gRNA1, AAV9P1_gRNA5 oder einer 1:1 Mischung aus beiden Vektoren transduziert. Als Negativkontrolle wurden Zellen mit dem AAV9P1_Luc Vektor transduziert (2.2.5). Alle Transduktionen wurden mit einer MOI von $1 \cdot 10^5$ durchgeführt. 96 h nach der Transduktion wurden die Zellen mit TNF- α behandelt (2.1.7), um eine Reaktivierung der latenten HIV Proviren zu ermöglichen. 30 h nach der Reaktivierung wurden die Zellen geerntet (2.2.3). Um eine Reaktivierung der latenten Proviren auf mRNA Level zu detektieren, wurden HIV-1 mRNAs mittels qPCR quantifiziert (2.3.12, 2.3.13, 2.3.14). Hierfür wurden Primer verwendet die alle viralen mRNA Spezies detektieren und im *nef* Gen lokalisiert sind (2.1.3). Außerdem wurde die Reaktivierung auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie (2.2.12) analysiert, wodurch die Expression von GFP untersucht werden konnte.

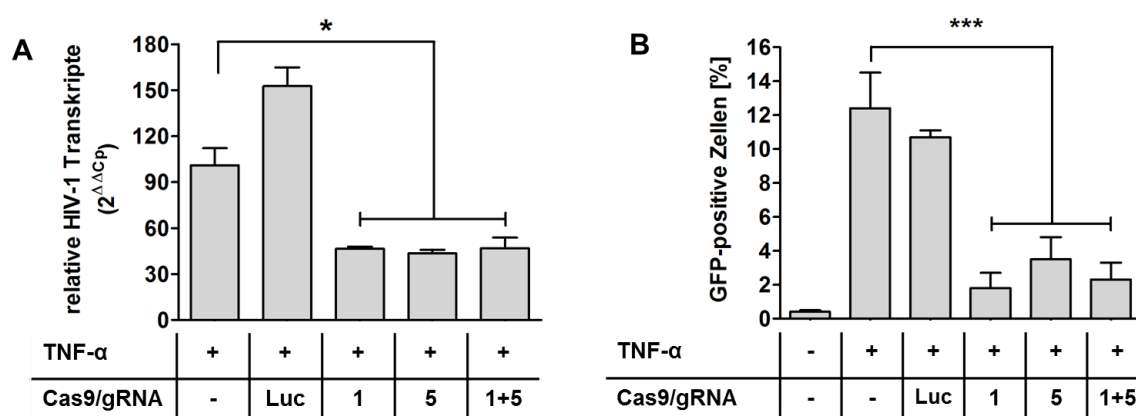


Abbildung 38: Inhibierung der HIV-Expression durch AAV9P1-vermittelte CRISPR/Cas9 Expression. Differenzierte HNSC.LatGFP1.2 Kulturen wurden entweder mit AAV9P1_Luc, AAV9P1_gRNA1, AAV9P1_gRNA5 oder einer 1:1 Mischung aus beiden gRNA Vektoren transduziert (MOI $1 \cdot 10^5$). 96 h nach der Transduktion wurden die Zellen mit

TNF- α für 30 h behandelt (10 ng/ml). Im Anschluss wurden die Zellen geerntet und (A) für eine RT-qPCR verwendet, um die Mengen an HIV Transkripten zu bestimmen und (B) mittels Durchflusszytometrie auf die Expression des GFP Reporters untersucht. Sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene kann eine signifikante Reduktion der HIV Expression beobachtet werden, wenn die Zellen vor der TNF- α Behandlung mit AAV9P1_gRNA1, AAV9P1_gRNA5 oder beiden Vektoren transduziert wurden. Daten aus der RT-qPCR wurden mithilfe der $2^{-\Delta\Delta C_p}$ Methode analysiert und sowohl auf Pol II, als auch auf nicht behandelte, nicht transduzierte HNSC.LatGFP1.2 Zellen bezogen. * $p \leq 0,05$; *** $\leq 0,001$.

Abbildung 38A zeigt die Ergebnisse der RT-qPCR. Da alle Werte auf unbehandelte und nicht transduzierte HNSC.LatGFP1.2 Zellen bezogen wurden, zeigt der erste Balken, dass die Behandlung der Zellen mit TNF- α zu einem Anstieg der HIV Transkripte um das $100,9 \pm 11,3$ -fache geführt hat. Auch bei Transduktion mit AAV9P1_Luc konnte ein Anstieg an HIV Transkripten (2. Balken) durch die TNF- α Behandlung beobachtet werden. Sowohl die Transduktion von HNSC.LatGFP1.2 Kulturen mit AAV9P1_gRNA1 als auch mit AAV9P1_gRNA5 führt zu einer signifikanten Abnahme der HIV Transkripte, was zeigt, dass beide gRNAs in der Lage sind die Reaktivierung von latenten HIV Proviren zu verhindern. Die Kombination beider gRNAs, die zu unterschiedlichen Mutationen führen sollte, zeigt keine stärkere Reduktion der HIV Transkripte im Vergleich zu den einzelnen gRNAs.

Um die Effekte von AAV9P1_gRNA1 und AAV9P1_gRNA5 auf die Reaktivierung weiter zu untersuchen, wurde die Expression des GFP Reporters, der im Provirus der HNSC.LatGFP1.2 Zellen vorhanden ist, untersucht (Abbildung 38B). Nach der Behandlung mit TNF- α zeigen die nicht transduzierten Zellen $12,4 \pm 2,1\%$ GFP positive Zellen. Kulturen die mit AAV9P1_Luc transduziert wurden zeigen $10,7 \pm 0,4\%$ GFP positive Zellen, was keinen signifikanten Unterschied zu nicht transduzierten Zellen darstellt. Kulturen, die mit AAV9P1_gRNA1 oder AAV9P1_gRNA5 transduziert wurden, zeigen eine signifikante Reduktion an GFP exprimierenden Zellen auf $1,8 \pm 0,9\%$ bzw. $3,5 \pm 1,3\%$. Auch auf Proteinebene zeigt die Kombination von beiden gRNAs keinen stärkeren Effekt als die einzelnen gRNAs ($2,3 \pm 1,0\%$ GFP positive Zellen).

3.4.2.5 Effekte auf HIV-1 Proviren in HNSC.LatGFP1.2 Kulturen nach der Transduktion mit AAV9P1 CRISPR/Cas9

Im Abschnitt 3.4.2.4 konnte gezeigt werden, dass die Transduktion von differenzierten HNSC.LatGFP1.2 Kulturen mit AAV9P1_gRNA1 und/oder AAV9P1_gRNA5 zu einer Inhibierung der HIV Expression, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene, führt (Abbildung 38). Um zu testen, ob dieser Effekt durch eine echte Inhibierung aufgrund der durch CRISPR/Cas9 hervorgerufenen Mutationen entstanden ist oder ob diese Mutationen zu einem Verlust an latent infizierten HNSC.LatGFP1.2 Zellen führt, wurde das in Abschnitt

3.4.2.4 beschriebene Experiment wiederholt. Nach der Zellernte wurde gDNA isoliert (2.3.11) und eine Quantifizierung an HIV Proviren (2.3.14) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 39 zusehen. Die Provirusmengen in nicht-transduzierten und nicht mit TNF- α behandelten diff. HNSC.LatGFP1.2 Kulturen (1. Balken) wurden hierbei als 100% gesetzt und die restlichen Werte beziehen sich auf die Provirusanzahl dieser Kultur. Differenzierte HNSC.LatGFP1.2 Kulturen, die nicht transduziert wurden, aber mit TNF- α behandelt wurden zeigen keinen Unterschied in der Provirusanzahl und belegen, dass die TNF- α Behandlung keinen Einfluss auf die Provirusanzahl hat. Auch Kulturen die mit AAV9P1_gRNA1 und/oder AAV9P1_gRNA5 transduziert und im Anschluss aktiviert wurden, zeigen keinen signifikanten Unterschied in der Provirusanzahl im Vergleich zu den nicht transduzierten, unbehandelten HNSC.LatGFP1.2 Kulturen. Somit konnte gezeigt werden, dass die Effekte auf die HIV Expression in Abbildung 38 nicht durch den Verlust an latent infizierten HNSC.LatGFP1.2 Zellen bedingt sind.

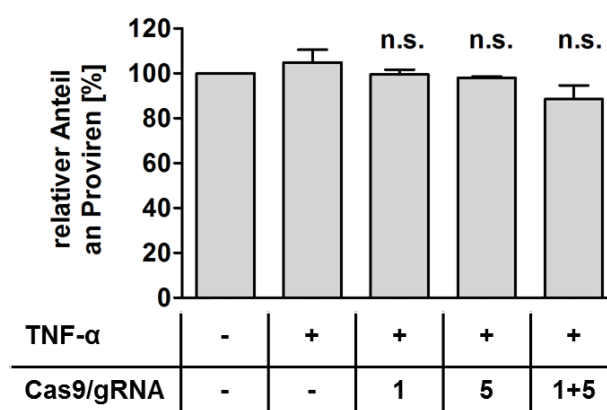


Abbildung 39: Provirus-Quantifizierung in HNSC.LatGFP1.2 Kulturen. Differenzierte HNSC.LatGFP1.2 Kulturen wurden mit AAV9P1_gRNA1 und/oder AAV9P1_gRNA5 transduziert und im Anschluss mit TNF- α behandelt. Nach der Provirus Quantifizierung in allen Kulturen, wurde die Menge an Proviren in nicht transduzierten und unbehandelten Kulturen (1. Balken) als 100% angesehen und die restlichen Werte darauf bezogen. Für die transduzierten Kulturen konnte kein signifikanter Unterschied in der Provirusanzahl festgestellt werden. n.s. = nicht signifikant.

Da die Transduktion von diff. HNSC.LatGFP1.2 Kulturen mit AAV9P1_gRNA1 und/oder AAV9P1_gRNA5 zu einer Reduktion der HIV Expression führt, diese sich aber nicht mit dem Verlust von latent infizierten Zellen erklären lässt, wurde im Folgenden untersucht, welche Mutationen CRISPR/Cas9 in den integrierten HIV Proviren hervorruft. Dafür wurden HNSC.LatGFP1.2 Zellen in 12-well Zellkulturschalen differenziert (2.2.3) und im Anschluss

mit AAV9P1_gRNA1 und/oder AAV9P1_gRNA5 transduziert. Als Negativkontrolle wurden Zellen mit AAV9P1_gRNALuc transduziert. Alle Transduktionen (2.2.5) wurden mit einer MOI von $1 \cdot 10^5$ durchgeführt. 96 h nach der Transduktion wurden die Zellen mit TNF- α reaktiviert (2.2.3), weitere 30 h später wurden die Zellen geerntet (2.2.3), gDNA wurde isoliert (2.3.11) und ein T7 Assay (2.3.10) wurde durchgeführt.

Der in Abbildung 40A dargestellte T7 Assay zeigt, dass sowohl bei unbehandelten Kulturen, als auch bei Kulturen, die mit AAV9P1_gRNALuc transduziert und im Anschluss aktiviert wurden, lediglich die zu erwartende PCR Bande (1000 bp) zu sehen ist. Es gibt keine Verdauprodukte, was zeigt, dass in diesen Kulturen keine durch CRISPR/Cas9 hervorgerufenen Mutationen vorhanden sind. Im Gegensatz dazu zeigen Kulturen, die mit AAV9P1_gRNA1 und/oder AAV9P1_gRNA5 transduziert und danach aktiviert wurden, Verdauprodukte unterhalb der PCR Bande (Pfeile). Der T7 Assay belegt damit, dass der HIV Provirus in diff. HNSC.LatGFP1.2 Kulturen durch CRISPR/Cas9 mutiert wurde. Erneut wurde mittels MiSeq Sequenzierung (2.3.15) ermittelt, welche Mutationen aufgetreten sind. Abbildung 40B zeigt, dass die Transduktion von diff. HNSC.LatGFP1.2 Kulturen durch AAV9P1_gRNA1 oder AAV9P1_gRNA5 zu ähnlichen Mutationen führt wie in Abbildung 37B, es lassen sich in beiden Fällen sowohl kleine Deletionen als auch Insertionen bzw. Punktmutationen nachweisen. Sobald Zellen mit beiden AAV Vektoren transduziert wurden, lassen sich erneut komplette Deletionen zwischen den beiden gRNA Bindestellen nachweisen. Diese Deletionen umspannen wichtige Transkriptionsfaktorbindestellen und reichen bis zum Transkriptionsstartpunkt (Abbildung 32) und erklären die Effekte auf die HIV Expression aus Abbildung 38.

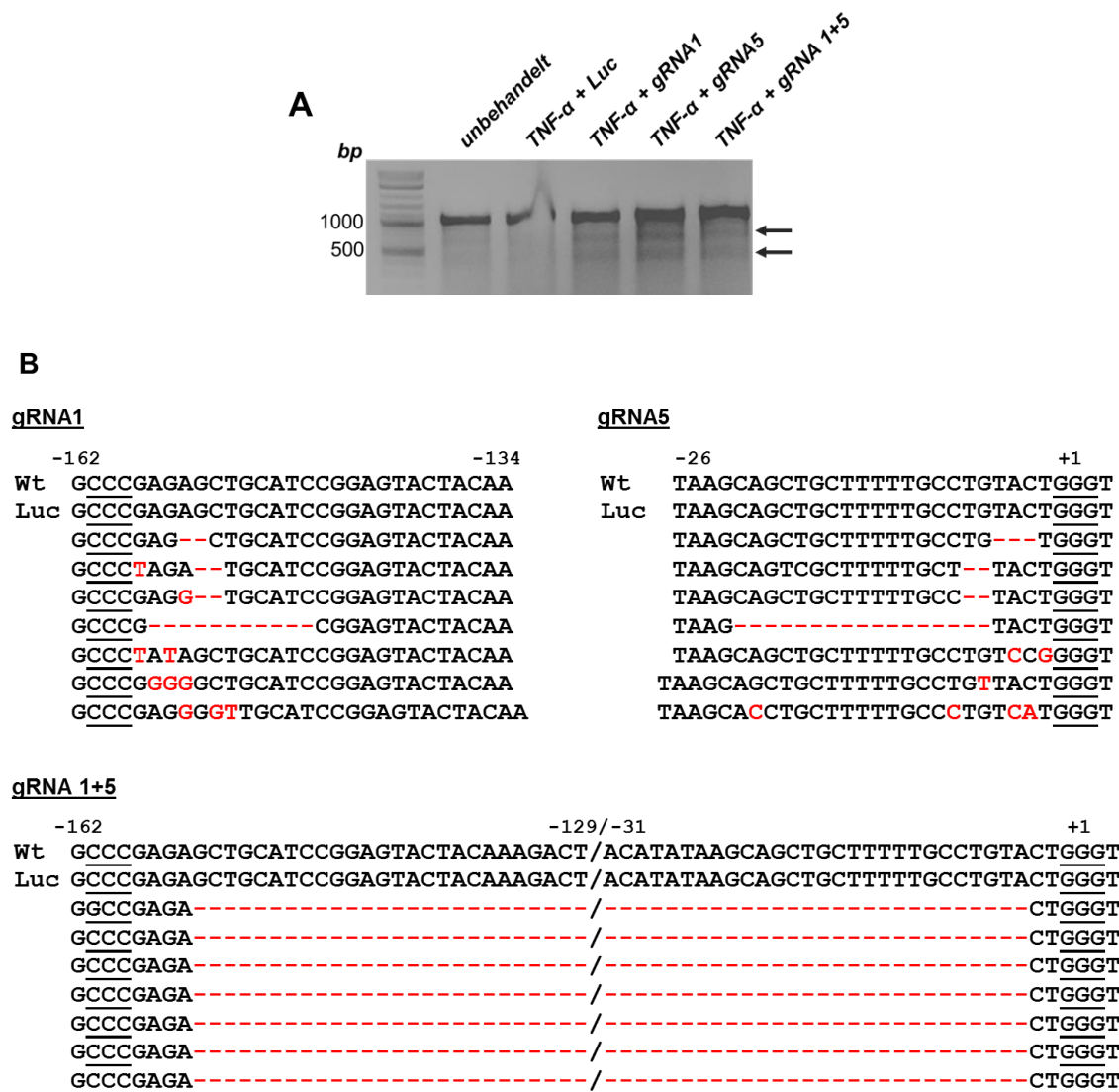


Abbildung 40: Analyse der durch CRISPR/Cas9 hervorgerufenen Provirusmutationen in HNSC.LatGFP1.2 Kulturen. Differenzierte HNSC.LatGFP1.2 Kulturen wurden mit AAV9P1_gRNA1 und/oder AAV9P1_gRNA5 transduziert und im Anschluss mit TNF- α aktiviert. (A) Ein T7 Assay zeigt, dass lediglich durch AAV9P1_gRNA1 und/oder AAV9P1_gRNA5 transduzierte Zellen Verdauungsprodukte durch die T7 Endonuklease aufweisen (Pfeile) und somit mutierte HIV Proviren enthalten. (B) Mit Hilfe einer MiSeq Sequenzierung wurden die Mutationsarten in transduzierten Zellen auf DNA Ebene nachgewiesen.

4 Diskussion

4.1 Identifizierung von AAV9P1 für die Transduktion von Astrozyten und neuralen Progenitorzellen

AAVs eignen sich sehr gut als virale Vektoren, da sie nicht pathogen sind und es zu keiner Integration des Transgens in das Wirtsgenom kommt. Zudem erlaubt die hohe Anzahl an verschiedenen Serotypen eine gewebespezifische Transduktion. Neben dem Einsatz von AAVs in der Grundlagenforschung, können sie auch für gentherapeutische Ansätze verwendet werden [96].

Momentan sind 12 verschiedene humane AAV Serotypen bekannt, die von AAV1 bis AAV12 durchnummeriert sind. Der am besten untersuchteste AAV Serotyp ist AAV2. Tabelle 22 zeigt eine Auflistung verschiedener Eigenschaften der AAV Serotypen 1-9. Da AAV10-12 wenig untersucht sind, wurden sie in der Tabelle nicht mit aufgeführt. In der 2. Spalte von Tabelle 22 ist die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz der verschiedenen AAVs im Vergleich zu AAV2 aufgelistet. Die Unterschiede in der Aminosäuresequenz sind hierbei vor allem in Kasidproteinbereichen zu finden, die auf der Oberfläche der Viruspartikel zu finden sind und somit einen direkten Einfluss auf den Zell-/Gewebetropismus eines AAVs haben [169].

Tabelle 22: Vergleich von verschiedenen Parametern der AAV Serotypen 1-9. AAV10-12 sind nicht detailliert charakterisiert und wurden deswegen nicht in die Tabelle aufgenommen [169].

	Sequenzidentität im Vgl. zu AAV2	Einsatz in Prä- klinischen Studien	Primärrezeptor	Sekundärrezeptor
AAV1	83%	Herz, ZNS, Muskulatur	N-glykosylierte Sialinsäure	-
AAV2	100%	ZNS, Auge	HSPG	FGFR1; HGFR, Integrine, CD9, LamR
AAV3	87%	-	HPSG	FGFR1, HGFR, LamR
AAV4	61%	Auge	O-glykosylierte Sialinsäure	-
AAV5	58%	ZNS	N-glykosylierte Sialinsäure	PDGFR
AAV6	83%	Muskulatur, Herz, ZNS	N-glykosylierte Sialinsäure;	EGFR

			HPSG	
AAV7	82%	-	-	-
AAV8	83%	Auge, ZNS	-	LamR
AAV9	82%	ZNS, Herz, Muskulatur	N-glykosylierte Galaktose	LamR

In präklinischen Studien, in denen AAVs zur Behandlung von Krankheiten des ZNS in Tieren benutzt wurden, kamen vor allem AAV2, AAV5, AAV6, AAV8 und AAV9 zum Einsatz. Der einzige Serotyp, der hierbei in der Lage war die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und somit intravenös verabreicht werden konnte, war AAV9 [169–173]. In einer Studie, die das Vorhandensein von neutralisierenden Antikörpern in 226 Menschen untersuchte, wurde zudem festgestellt, dass alle Studienteilnehmer zum Teil sehr hohe Mengen an Antikörpern gegen verschiedene AAV Serotypen aufwiesen, was zu Problemen bei gentherapeutischen Ansätzen führen kann [174]. Obwohl es also eine Vielzahl an natürlichen AAV Serotypen gibt, ist es dennoch wichtig neue Varianten mit verbesserten Eigenschaften zu generieren.

Um einen geeigneten synthetischen AAV-Vektor zu identifizieren, der in der Lage ist Astrozyten und neurale Progenitorzellen zu transduzieren, wurden sowohl proliferierende als auch differenzierte HNSC.100 Zellen mit insgesamt 5 Wildtyp AAVs und 30 durch Peptide-Display modifizierten AAVs transduziert (3.1.1). Der Einbau kurzer Aminosäuremotive hatte hierbei unterschiedliche Effekte auf die Transduktionsrate, welche anhand der Insertion von P1 diskutiert werden (Abbildung 16). Bei proliferierenden HNSC.100 Zellen führt die Insertion von P1 in Wildtyp Kapside in drei Fällen zu einer Verbesserung der Transduktionseffizienz im Vergleich zum Wildtyp (AAV1P1, AAV8P1, AAV9P1) und in zwei Fällen zu einer Verschlechterung (AAV2P1, AAV6P1). Auch bei den differenzierten HNSC.100 Zellen resultiert die Integration von P1 in unterschiedlichen Effekten auf die Transduktionsrate. Während AAV1P1, AAV2P1, AAV8P1 und AAV9P1 eine erhöhte Transduktion zeigen, verschlechtert sich die Transduktion bei AAV6P1 im Vergleich zum Wildtyp AAV6. Ähnliche Ergebnisse können auch bei der Insertion von weiteren Peptiden in unterschiedliche AAV Kapside beobachtet werden. Es zeigt sich also, dass nicht die alleinige Insertion eines Peptides die Transduktionsrate bestimmt, sondern, dass das Zusammenspiel von Kapsid und Peptid entscheidend ist.

Sowohl bei differenzierten als auch bei proliferierenden Zellen zeigen AAV1P1 als auch AAV9P1 die stärksten Transduktionsraten (Abbildung 16). Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde mit AAV9P1 gearbeitet, da zum einen die Transduktionseffizienz etwas besser war als bei AAV1P1 und zum anderen da der AAV9P1 zugrundeliegende AAV9 Serotyp

Eigenschaften aufweist, die nützlich für die Transduktion von ZNS Zellen sind. So ist AAV9 wie bereits beschrieben in der Lage die Blut-Hirn Schranke zu überwinden [175,176]. Zudem wurden für AAV9 im Vergleich zu AAV1 weniger neutralisierende Antikörper in Probanden gefunden, was den Einsatz von AAV9 als gentherapeutischen Vektor begünstigt [174]. Es gibt bereits eine erste klinische Studie der Phase I, die die Verträglichkeit und die Auswirkungen von intravenösen AAV9 Injektionen im Menschen untersucht. In dieser Studie werden Kinder bis zu einem Alter von 6 Monaten, die unter Spinaler Muskelatrophie leiden, mit einem AAV9 Vektor behandelt, der für das SMN1-Gen kodiert. Dieses Gen ist bei der Spinalen Muskelatrophie aufgrund einer Mutation defekt. Als Folge kommt es zu einem Verlust an Motoneuronen, was letztendlich zu Muskelschwund führt. In dieser Studie wird AAV9 benutzt, um Neuronen zu transduzieren ([173]; <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02122952>, 10.04.2017). Foust *et al.*, 2009 konnten zeigen, dass AAV9 nach der Injektion in die Schwanzvene von Mäusen in neonatalen Mäusen Neuronen und in adulten Mäusen Astrozyten bevorzugt transduziert [177]. Auch andere Studien zeigen, dass AAV9 sowohl Neuronen und als auch Astrozyten transduziert [176,178–180]. Insgesamt ist ein auf AAV9-basierender Vektor, der effizient Astrozyten transduziert ein vielversprechender Ansatz nicht nur für Grundlagenforschung, sondern auch für *in vivo* Applikationen.

4.2 Transduktionseigenschaften von AAV9P1

4.2.1 Analyse der Zellspezifität von AAV9P1

Ein zellspezifischer Vektor ist sowohl in der Grundlagenforschung als auch in *in vivo* Experimenten von Vorteil, da er in der Lage ist ein Transgen auch in gemischten Zellpopulationen nur im gewünschten Zelltyp zur Expression zu bringen. Vor allem bei gentherapeutischen Ansätzen sollte der verwendete Vektor einen hohen Zell-/ Gewebetropismus aufweisen, um zu verhindern, dass es zu negativen Nebeneffekten in gesunden Zellpopulationen kommt [110].

AAV9P1 wurde für die Transduktion von neuronalen Progenitorzellen und Astrozyten identifiziert (3.1.1). Um zu überprüfen, ob der Vektor auch andere Zelllinien des ZNS als die zuvor getesteten HNSC.100 Kulturen transduziert, wurden verschiedene Zelllinien mit der gleichen Vektormenge transduziert. Da AAV9P1 eine Expressionskassette für das Reporterprotein EYFP unter der Kontrolle des ubiquitären CMV Promoters enthält, konnte nach der Transduktion der Anteil an EYFP-positiven und somit der erfolgreich transduzierten Zellen ermittelt werden. AAV9P1 transduziert sowohl neurale Progenitorzellen als auch verschiedene Astrozytomzelllinien. Es konnte jedoch nur eine sehr schwache Transduktion von neuronalen Zellen und Mikrogliazellen beobachtet werden (Abbildung 19). Diese

Beobachtung konnte auch bei der Verwendung von hiPSC-abgeleiteten ZNS-Zellen gemacht werden, die mit AAV9P1 transduziert wurden (Abbildung 21). Selbst in gemischten Zellpopulationen (=Organoide) transduzierte AAV9P1 bevorzugt Astrozyten im Vergleich zu Neuronen (Abbildung 23).

Der Zelltropismus eines Virus ist durch die virale Oberfläche, im Fall von AAVs durch die Kapsidproteine, bedingt. AAV9 benutzt als Rezeptor für die Transduktion von Zellen terminale, N-glykosylierte Galaktosereste von zellulären Oberflächenproteinen [181]. Das AAV9 Kapsid enthält als Bindestelle für Galaktose eine aus fünf Aminosäuren bestehende Tasche [182]. Als weiteren zellulären Rezeptor für die Transduktion von Zellen durch AAV9 wurde der 37/67 kDa-Laminin Rezeptor identifiziert [183]. Außerdem enthält AAV9P1 im Vergleich zu AAV9 ein zusätzliches Integrinbindemotiv (=RGD) in der Aminosäuresequenz des Kapsidproteins (Abbildung 17). Alle drei Oberflächenstrukturen (N-glykosylierte Galaktosereste, Laminin-Rezeptor, Integrine) sind sowohl auf der Zelloberfläche von Neuronen als auch auf Astrozyten zu finden und erfüllen dort verschiedene Funktionen [184–188]. Die erhöhte Zellspezifität von AAV9P1 für Astrozyten lässt sich daher wahrscheinlich eher durch ein Zusammenspiel der drei Strukturen erklären.

Für gentherapeutische Ansätze sollte ein Vektor zur Behandlung von ZNS Krankheiten am besten intravenös verabreichbar sein, da somit eine komplizierte und risikobehaftete direkte Applikation ins ZNS des Patienten vermieden werden kann. Bei der intravenösen Verabreichung eines AAV Vektors ist es von großer Bedeutung, dass der Vektor nur den gewünschten Zelltyp transduziert. Um zu überprüfen welche Zelltypen AAV9P1 außerhalb des ZNS transduziert, wurden verschiedene Zelllinien aus verschiedenen Geweben mit dem Vektor transduziert (Abbildung 24). Erneut konnte bestätigt werden, dass AAV9P1 in der Lage ist neuronale Progenitorzellen und astrozytäre Zellen zu transduzieren. AAV9P1 war nicht in der Lage eine T-Zelllinie zu transduzieren und zeigt eine schwache Transduktion in HEK293T ($17,9 \pm 5,7\%$) und HeLa ($15,3 \pm 8,1\%$) Zellen. Eine deutliche Transduktion durch AAV9P1 war in der Hepatozyten Zelllinie Huh7 ($83,4 \pm 15,1\%$) zu beobachten und auch HepG2 Zellen ($38,6 \pm 6,7\%$) wurden von AAV9P1 transduziert. Auch der AAV9 Serotyp zeigt bei intravenöser Verabreichung in Mäusen eine starke Transduktion von Lebergewebe [189]. Insgesamt scheint das Kapsid von AAV9P1 nicht spezifisch für ZNS Zellen zu sein.

4.2.2 Strategien zur Erhöhung der Zellspezifität

Eine Möglichkeit die Transgenexpression auf ein bestimmtes Gewebe zu begrenzen, ist der Einsatz von gewebespezifischen Promotoren für die Transkription des Transgens. In dieser Arbeit wurde zum einen der verkürzte Nestin Promotor Nes714 (3.2.2.1) und zum anderen der verkürzte GFAP Promotor gfaABC₁D (3.2.2.2) verwendet.

Das Nes714 Promotorkonstrukt besteht aus einem 107 bp langen HSV tk Promotor und einem 714 bp langen Abschnitt aus dem 2. Intron des humanen Nestingens (Abbildung 25A). Es wurde beschrieben, dass transgene Mäuse, die LacZ unter der Kontrolle des Nes714 Konstrukts exprimieren, eine LacZ Expression zeigen, die der endogenen Nestinexpression im ZNS gleich ist. Vor allem in neuronalen Progenitorzellen und in frühen Zellen der Neuralleiste wurde lacZ Expression detektiert. Nur ein geringer Anteil an transgenen Tieren (7 aus 48 Tieren) zeigte LacZ Expression außerhalb des ZNS. Allerdings wurde nicht genauer untersucht in welchen Geweben LacZ Expression auftrat [138]. Auch in *in vitro* kultivierten Astrozyten- und Progenitorkulturen, welche aus adulten Nes714/lacZ transgenen Mäusen isoliert wurden, war eine LacZ Expression detektierbar [190]. Es konnte gezeigt werden, dass das Nes714 Enhancerelement verschiedene Bindestellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren enthält, die eine Progenitor-spezifische Expression vermitteln. Zu diesen Transkriptionsfaktoren gehören Mitglieder der POU-Proteinfamilie, die vor allem an der Entwicklung des ZNS beteiligt sind [191]. Die Ergebnisse aus Abbildung 25B zeigen, dass alle mit pLVTHM_Nes714 transfizierten Zelllinien, die aus verschiedenen Geweben stammen, GFP exprimieren und somit ein aktives Nes714 Promotorkonstrukt aufweisen. Es konnte also gezeigt werden, dass das Nes714 Konstrukt keine spezifische Transgenexpression in ZNS Zellen hervorruft. Dies könnte daran liegen, dass der 107 bp lange HSV tk Promotor auch ohne ein vorgeschaltetes Enhancerelement aktiv ist und somit die Transkription vermittelt oder dass das Nes714 Intronfragment keine ausreichende Spezifität gewährleistet.

Der zweite Promotor, der in dieser Arbeit getestet wurde, war der gfaABC₁D Promotor. Der gfaABC₁D Promotor ist eine auf 681 bp verkürzte Version des humanen GFAP Promotors. Es konnte gezeigt werden, dass gfaABC₁D-nLacZ transgene Mäuse eine ZNS-weite Astrozyten-spezifische LacZ Expression aufwiesen, während nur in vereinzelt Tieren eine leichte LacZ Expression in Neuronen beobachtet werden konnte [137]. Der gfaABC₁D Promotor wurde bereits in Kombination mit AAV5 zur Transduktion von Mäusen benutzt. Auch hierbei konnte eine Astrozyten-spezifische Transgenexpression beobachtet werden. In den Studien wurde der AAV5 Vektor entweder in den Cortex oder den Hippocampus der Tiere injiziert, wodurch keine Daten zum Expressionsverhalten von gfaABC₁D in Zellen außerhalb des ZNS existieren [192–194]. In Abbildung 26B sind verschiedene Zelllinien zu sehen die entweder mit pLVTHM (EF1- α Promotor) oder mit pLVTHM_gfaABC₁D transfiziert wurden. Alle transfizierten Zelltypen, in denen die GFP Transkription unter der Kontrolle des ubiquitären EF1- α Promotors steht, weisen GFP positive Zellen auf. Nach der Transfektion mit pLVTHM_gfaABC₁D exprimieren nur proliferierende HNSC.100 Zellen GFP. Als nächstes wurde der Vektor AAV9P1_gfaABC₁D-EYFP erzeugt, der für ein unter der Kontrolle des gfaABC₁D Promotor stehendes EYFP kodiert. Verschiedene Zelltypen wurden

mit der jeweils gleichen Vektormenge transduziert (Abbildung 27) und auf die Expression von EYFP untersucht. Weder in Jurkat, HEK293T oder HeLa noch in primären PBMCs konnte eine EYFP Expression nachgewiesen werden. Auch in Leberzelllinien (Huh7, HepG2) konnte keine EYFP Expression beobachtet werden. Obwohl zuvor gezeigt wurde, dass AAV9P1 Leberzelllinien transduziert (Abbildung 24). Dennoch führte die Kombination aus AAV9P1 und dem gfaABC₁D Promotor zu keiner EYFP Expression in Leberzelllinien.

Im Vergleich zur AAV9P1 Transduktion, bei der ein CMV Promotor die EYFP Transkription steuert, zeigen proliferierende HNSC.100 Kulturen nach der Transduktion mit AAV9P1_gfaABC₁D-EYFP einen geringeren Anteil an EYFP-positiven Zellen. Differenzierte HNSC.100 und TH4-7-5 Kulturen weisen immer noch einen hohen Anteil an EYFP-positiven Zellen auf ($61,7 \pm 0,1\%$ bzw. $50,3 \pm 11,1\%$), der aber im Vergleich zu AAV9P1 Transduktionen niedriger ist ($76,2 \pm 15,6\%$ bzw. $92,3 \pm 11,7\%$). U-251 MG und U-87 MG Kulturen zeigen keine EYFP-positiven Zellen. Da in Abbildung 19 gezeigt werden konnte, dass die beiden Zelllinien durch AAV9P1 transduzierbar sind, begründet sich die Abwesenheit von EYFP-positiven Zellen durch den Einsatz des gfaABC₁D Promotors.

Die unterschiedlich starke Expression des EYFP Transgens in astrozytären Zelllinien, kann mit der verschieden starken Expression des endogenen GFAP in den einzelnen Zelllinien zusammenhängen. Astrozyten sind eine heterogene Zellpopulation, die abhängig vom Entwicklungsstadium, der Funktion oder des Aktivierungsstadiums unterschiedliche GFAP Expressionsmuster aufweisen [195]. Auch in Proben von Gliompatienten wurden unterschiedlich starke GFAP Expressionslevel gefunden [196].

Für differenzierte HNSC.100 Zellen wurde bereits gezeigt, dass diese hohe Mengen an GFAP exprimieren [166]. Auch die den TH4-7-5 zugrunde liegende Astrozytomzelllinie 85HG66 zeigt endogene GFAP Expression [155]. Diese deutlichen GFAP Expressionen lassen darauf schließen, dass der endogene GFAP Promotor in diesen Zelllinie aktiv ist und somit auch die für die Aktivierung des gfaABC₁D Promotor benötigten Transkriptionsfaktoren exprimiert werden. Für U-251 MG und U-87 MG sind unterschiedliche Daten zur GFAP Expression beschrieben. Restrepo *et al.*, 2011 zeigen, dass U-251 MG hohe GFAP mRNA Level exprimieren, während in der gleichen Studie U-87 MG sehr niedrige GFAP mRNA Mengen aufweisen. Der Unterschied in den mRNA Leveln wird in dieser Studie durch die unterschiedlich starke Methylierung des GFAP Promotors erklärt [196]. Auch auf Proteinebene ist beschrieben, dass U-251 MG nachweisbare GFAP Level aufweisen, während in U-87 MG kein GFAP Protein nachgewiesen werden konnte [197]. Die fehlende GFAP Expression in U-87 MG Zellen zeigt eine Erklärung auf warum auch der gfaABC₁D Promotor in dieser Zelllinie nicht aktiv ist. Warum der gfaABC₁D Promotor in U-251 MG Kulturen nicht aktiv ist, obwohl es der endogene GFAP Promotor nachweislich ist,

könnte unterschiedliche Gründe haben. So wurde gezeigt, dass einige Astrozytomzelllinien durch längere Kultivierung GFAP Expression verlieren [198]. Ein anderer Grund könnte sein, dass durch die Verkürzung des humanen 2,2 kb großen GFAP Promotor auf den 681 bp großen gfaABC₁D Promotor wichtige Bindestellen für die Promotoraktivierung in U-251 MG Zellen verloren gegangen sind.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass der Einsatz von zellspezifischen Promotoren eine gute Möglichkeit ist die Expression eines AAV-vermittelten Transgens auf einen bestimmten Zelltyp zu beschränken. Zuvor muss jedoch genau untersucht werden, ob ein Promotor die erforderliche Zellspezifität leisten kann. Im Fall des gfaABC₁D Promotors muss zudem berücksichtigt werden, ob im Bezug auf die gewünschte Anwendung eine geringere Transkriptionsstärke (im Vgl. zu einem CMV Promotor) und eine eventuelle Inaktivität in bestimmten Subpopulationen toleriert werden kann. Ein weiterer Punkt der bei dem Einsatz von zellspezifischen Promotoren im AAV Kontext beachtet werden muss, ist die geringe Verpackungskapazität von AAVs (1.2.3). Promotoren müssen demnach nicht nur spezifisch sein, sondern sollten auch klein genug sein, um genügend Platz für die restliche Expressionskassette zu gewährleisten. Eine Alternative zu zellspezifischen Promotoren bietet das „miRNA De-Targeting“, das eine Transgenexpression in ungewünschten Zellen verhindert. Hierfür wird zuerst eine miRNA identifiziert, die ausschließlich in dem ungewünschten Zelltyp exprimiert wird. Als nächstes kloniert man in den 3' Bereich des AAV Transgens eine zu dieser miRNA komplementäre Sequenz. Transduziert nun der AAV den ungewünschten Zelltyp und das Transgen wird exprimiert, so bindet die endogene miRNA an die komplementäre Sequenz und es entsteht ein doppelsträngiges RNA Molekül, das von der Zelle abgebaut wird [199,200]. Es sollte also immer abgewogen werden, welche Strategie für eine zellspezifische Transgenexpression in einem bestimmten experimentellen Ansatz eingesetzt wird.

4.2.3 Analyse der Langzeittransduktion von HNSC.100 Zellen durch AAV9P1

Ein viraler Vektor, der auch in *in vivo* Applikationen Anwendung finden soll, sollte in der Lage sein eine langanhaltende Transgenexpression zu vermitteln, vor allem da es sich bei Astrozyten um eine langlebige Zellpopulation handelt [62].

Um zu überprüfen, ob AAV9P1 in der Lage ist eine Langzeit-Transgenexpression zu vermitteln, wurden sowohl proliferierende als auch differenzierte HNSC.100 Zellen mit AAV9P1_CMV-EYFP transduziert. Differenzierte HNSC.100 Kulturen wurden zusätzlich mit AAV9P1_gfaABC₁D-EYFP transduziert. Sowohl die Zellzahl als auch die Transgenanzahl und der Anteil an EYFP-positiven Zellen wurden in allen transduzierten Zellpopulationen über einen Zeitraum von 49 Tagen beobachtet. Im Vergleich zu nicht transduzierten Zellen

zeigen proliferierende HNSC.100 Kulturen nach der Transduktion keinen Unterschied bezogen auf die Zellzahl. Beide Populationen teilen sich regelmäßig und wurden ab Tag 7 nach der Transduktion zweimal wöchentlich passagiert (Abbildung 29A). Bei der Anzahl an EYFP Transgenen zeigt sich, dass an Tag 1 nach der Transduktion eine sehr hohe Transgenanzahl detektiert wurde, welche im Verlauf des Experiments kontinuierlich mit jeder Passage abnahm, bis ab Tag 24 keine Transgene mehr nachgewiesen werden konnten (Abbildung 29B). Auch der Anteil an EYFP-positiven Zellen nimmt ab Tag 7 (= 1. Passage) ab (Abbildung 29C). Die Abnahme der Transgenanzahl und der EYFP-exprimierenden Zellen zeigt, dass das AAV9P1 vermittelte Transgen nicht in das Wirtsgenom integriert war, da es in diesem Fall auch über mehrere Passagen hinweg erhalten geblieben wäre. In proliferierenden Zellen ist AAV9P1 also nicht in der Lage eine Langzeit-Transgenexpression zu vermitteln.

Bei differenzierten HNSC.100 Kulturen zeigt der Vergleich der Zellzahlen, dass die beiden transduzierten Populationen im Vergleich zu nicht transduzierten Kulturen keinen Unterschied aufweisen (Abbildung 30A). Eine Langzeit-Transgenexpression führt also zu keinen toxischen Effekten in den transduzierten Kulturen. Ähnlich wie bei proliferierenden HNSC.100 Populationen ist auch die Anzahl an EYFP Transgenen zu Beginn des Experiments sehr hoch und nimmt dann im Verlauf der Beobachtungsphase stetig ab, allerdings ist bei beiden differenzierten HNSC.100 Kulturen auch an Tag 49 nach der Transduktion noch immer eine deutliche Transgenanzahl detektierbar (Abbildung 30B). Auf Proteinebene erreichen die differenzierten Populationen erst 4 Tage nach der Transduktion das Maximum an EYFP-positiven Zellen, dieser hohe Wert wird aber über die gesamte Länge des Experiments beibehalten (Abbildung 30C). AA9P1 ist also in der Lage eine Langzeit-Transgenexpression in Astrozyten zu etablieren.

Obwohl die Daten aus dem Langzeitexperiment der proliferierenden HNSC.100 Zellen vermuten lassen, dass es nach einer AAV9P1 Transduktion zu keiner Integration in das Wirtsgenom kommt, sollte dieser Punkt in der Zukunft genauer untersucht werden. Verschiedene Studien zeigen, dass AAV-vermittelte Transgene bevorzugt als Episome in Zellen zu finden sind [105,201]. Allerdings gibt es auch eine zunehmende Anzahl an Studien, die zeigt, dass es nach einer AAV Transduktion zur Integration des Transgens in das Wirtsgenom kommen kann. Diese Integrationen treten im Vergleich zur Wildtyp AAV Infektion (1.2.2) selten auf und sind willkürlich über das Genom verteilt. Zudem wurden die meisten Integrationen in sich teilenden Zellpopulationen gefunden [202]. Es ist also wichtig für einen neu identifizierten AAV Vektor auch das Integrationsverhalten genau zu untersuchen.

4.3 Inhibierung der HIV Expression in persistent infizierten Astrozyten

Astrozyten stellen als latentes HIV Reservoir eine besondere Herausforderung dar. Da sie durch die Blut-Hirn Schranke vom restlichen Körper isoliert sind, sind sie nur unzureichend durch cART oder andere Medikamente erreichbar (1.1.4). Gleichzeitig ist die HIV Infektion von Astrozyten ein beachtliches Gesundheitsrisiko für Patienten, da Astrozyten eine Vielzahl an lebenswichtigen Funktionen im ZNS erfüllen und diese durch eine HIV Infektion beeinträchtigt sind (1.1.5.1). Im Allgemeinen bietet der Einsatz von gentherapeutischen Ansätzen zur Bekämpfung von latenten HIV Reservoiren im Vergleich zu einer medikamentösen Behandlung, wie es die „shock and kill“ Strategie vorschlägt, einige Vorteile. Eine detaillierte Auflistung der Nachteile von „shock and kill“ ist in der Einleitung im Abschnitt 1.1.5.2 zu finden. Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Gama *et al.*, 2017 konnte erstmals *in vivo* Daten liefern, die belegen, dass ein „shock and kill“ Ansatz negative Effekte hat [203]. In dieser Studie wurden 3 Makaken mit einem SIV Stamm infiziert, der in 80% der Tiere HAND Symptome hervorruft. Die Tiere wurden mit cART Medikamenten behandelt, die die Blut-Hirn Schranke überwinden. Wie zu erwarten nahm die Viruslast stark ab. Zwei der Tiere wurden neben der cART Behandlung mit zwei LRAs behandelt. Es konnte beobachtet werden, dass der Einsatz der LRAs in einem Tier zu erhöhten Viruslasten im Plasma aber auch im CSF (*engl.* cerebrospinal fluid) des Tieres führte. Zudem konnte festgestellt werden, dass das Tier erhöhte Level an Immunsystem-aktivierenden Proteinen und an neurotoxischen Proteinen aufwies. Obwohl das Tier gleichzeitig mit cART Medikamenten und LRAs behandelt wurde, zeigte es im Vergleich zum Kontrolltier (keine Behandlung mit LRAs) deutliche neurologische Symptome, die belegen, dass ZNS Reservoir eine wichtige Rolle im Krankheitsverlauf von HIV Patienten spielen und dass eine absichtliche Re-Aktivierung von Reservoiren deutliche Auswirkungen haben kann [203]. Diese Studie verdeutlicht, dass es wichtig ist neben dem „shock an kill“ Ansatz auch den „soothe and snooze“ Ansatz weiter zu erforschen (1.1.5.2).

4.3.1 Überexpression des zellulären Restriktionsfaktors 16.4.1 nach AAV9P1 vermittelter Transduktion

Die 16.4.1 Sequenz ist der C-terminale Bereich der Fam21/Risp Proteinfamilie. Die durch Transfektion vermittelte Überexpression von 16.4.1 führt in persistent HIV infizierten Astrozytomzellen zu einer Verringerung der HIV Replikation, während eine verminderte 16.4.1 Expression in den gleichen Zellen die HIV Replikation erhöht. Als viraler Interaktionspartner von 16.4.1 wurde Rev identifiziert. 16.4.1 sorgt für die Anreicherung von Rev im Zytoplasma und verhindert somit eine erfolgreiche HIV Replikation [83,84]. Analysen der endogenen 16.4.1 mRNA Level in verschiedenen Zelltypen haben gezeigt, dass 16.4.1 in allen Zelltypen unterschiedlich stark exprimiert wird. Allerdings konnte auch gezeigt

werden, dass der antivirale Effekt von 16.4.1 nur in latenten astrozytären Reservoiren auftritt, während in CD4-positiven T-Lymphozyten, die sich durch eine aktive HIV Replikation auszeichnen, kein antiviraler Effekt beobachtet wurde [204].

Um zu überprüfen, ob AAV9P1 in der Lage ist HIV-inhibierende Sequenzen erfolgreich in persistent infizierte Astrozyten zu transportieren, wurden die Vektoren AAV9P1_ gfaABC₁D-16.4.1-EYFP und als Kontrolle AAV9P1_ gfaABC₁D-EYFP benutzt um TH4-7-5 Kulturen zu transduzieren (Abbildung 31). Es konnte festgestellt werden, dass bei der Transduktion der Zellen mit AAV9P1_ gfaABC₁D-16.4.1-EYFP sowohl die extrazellulären Gag-p24 als auch die intrazellulären Gag-p24 Level im Vergleich zu nicht transduzierten Zellen und zu AAV9P1_ gfaABC₁D-EYFP transduzierten Zellen signifikant verringert waren. AAV9P1 war demnach in der Lage den HIV Restriktionsfaktor erfolgreich in persistent infizierte Astrozyten einzubringen und ist somit in der Lage die Expression von HIV-inhibierenden Sequenzen in Astrozyten zu vermitteln.

4.3.2 Verwendung von CRISPR/Cas9 zur Inaktivierung von latenten HIV Proviren in Astrozyten

Genomeditierungssysteme bieten den Vorteil, dass es mit ihnen möglich ist gezielt HIV Proviren anzugreifen ohne dabei in andere zelluläre Abläufe einzugreifen oder gar andere latente Virusinfektionen zu reaktivieren [75]. Der Vergleich von verschiedenen Genomeditierungssystemen (1.3.1) zeigt, dass CRISPR/Cas9 einige Vorteile im Vergleich zu anderen Systemen bietet. Obwohl die Tre Rekombinase in der Lage ist den HIV Provirus nicht nur zu mutieren, sondern ihn komplett aus dem Wirtsgenom zu entfernen, enthält diese Methode doch Nachteile. So kann jede Tre Rekombinase nur die LTRs eines HIV Stammes binden, es muss also für jeden Stamm eine neue Rekombinase evolviert werden, was aufwendig ist und viel Zeit in Anspruch nimmt. Dementsprechend ist es auch mit großem Aufwand verbunden auf HIV Resistenzmutanten zu reagieren. Das gleiche Problem tritt auch bei ZNF-Nukleasen und TALENs auf. Auch hier liegt ein großer Nachteil darin, dass die DNA-Bindung über Proteinsequenzen erfolgt, die nur sehr aufwändig geändert werden können [124].

CRISPR/Cas9 bietet hier den Vorteil, dass die DNA-Bindung über ein RNA Molekül erfolgt, welches schnell und einfach neu eingesetzt werden kann. Ein weiterer Vorteil ist, dass mit CRISPR/Cas9 mehrere Gene oder Genabschnitte innerhalb desselben Gens gleichzeitig mutiert werden können. Dafür werden mehrere gRNAs zusammen mit Cas9 in eine Zielzelle eingeführt. Bei den anderen Systemen müsste für jede Einzelmutation ein neue DNA-Bindedomäne entworfen werden und diese dann simultan in die Zelle eingebracht werden [126,205,206].

Des Weiteren konnte in Studien mit Mäusen, die Cas9 dauerhaft in allen Geweben

exprimieren, gezeigt werden, dass weder in den Mäusen selbst noch in den Nachkommen toxische Effekte beobachtet werden konnten [207]. Wohingegen verschiedene toxische Effekte durch die Expression der Cre Rekombinase in Mäusen beschrieben wurden [208,209].

Ein Nachteil von Genomeditierungssystemen im Einsatz gegen latente Proviren ist, dass für den Transport virale Vektoren benötigt werden, die verschiedene Eigenschaften erfüllen sollten: (a) Induktion einer Gewebespezifischen Transgenexpression, (b) Induktion einer Langzeit-Transgenexpression ohne Integration des Transgens in das Wirtsgenom. AAV9P1 erfüllt diese Voraussetzungen (4.2), wodurch die Kombination von CRISPR/Cas9 und AAV9P1 ein vielversprechender Ansatz zur Behandlung von latenten Proviren in Astrozyten ist.

4.3.2.1 Design und Identifizierung von potenten gRNAs

Der wahrscheinlich wichtigste Schritt in der Verwendung von CRISPR/Cas9 ist das Entwerfen der gRNAs. Hierbei muss vor allem darauf geachtet werden die Wahrscheinlichkeit für off-target Effekte zu minimieren. In dieser Arbeit wurden deswegen alle gRNAs zum einen mit zwei verschiedenen Datenbanken gegen das humane Genom abgeglichen und zum anderen mit Hilfe des Online Tools von Hsu *et al.*, 2013 die off-target Scores ermittelt, die angeben wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass es zu einer Bindung der gRNA an ungewollte Sequenzen im Genom kommt (Tabelle 21, [127]). Gleichzeitig müssen gRNAs auch danach ausgewählt werden, ob sie an den passenden Genabschnitt binden, da nur Sequenzen als gRNA verwendet werden können, die direkt an ein PAM angrenzen (1.3). In dieser Arbeit wurden 6 verschiedene gRNAs entworfen (3.4.2.1), die sowohl in den Labor HIV-Stämmen NL43 und LAI als auch in verschiedenen HIV Subtypen binden. Fünf der gRNAs binden im Bereich des 5' LTRs und wurden so ausgewählt, dass sie an für die Transkription des Provirus wichtige Elemente binden. Guide RNA 6 hingegen bindet an die Hauptspleißdonorstelle, von der aus eine Vielzahl an viralen Transkripten gespleißt wird (Abbildung 32). Mit diesen gRNAs soll verhindert werden, dass nach der Reaktivierung einer latent infizierten Astrozytenzelle neurotoxische Proteine exprimiert werden. Gleichzeitig wird so auch der HIV Replikationszyklus inhibiert. Da die meisten gRNAs (bis auf gRNA6) in mehreren HIV Subtypen binden, können die gRNAs auch gegen verschiedene HIV Infektionen eingesetzt werden.

Obwohl keine der gRNAs beim Alignment mit dem humanen Genom einen Treffer erzielte und es somit keine 100%ige Übereinstimmung mit humanen Genomabschnitten gibt, unterscheiden sich die off-target Werte in Tabelle 21, 7. Spalte deutlich voneinander. Dies liegt daran, dass das Online-Tool von Hsu *et al.*, 2013 die einzelnen gRNAs nicht nur auf vollständige Übereinstimmung mit dem humanen Genom überprüft, sondern auch prüft wie

hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass eine gRNA an eine ähnliche humane Sequenz bindet [127]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass gRNAs einzelne Nukleotidabweichungen an den Positionen 1-7 (distal vom PAM) tolerieren und trotzdem an diese Bereiche binden [210]. Abweichungen in Nukleotidpositionen 10-12 (proximal zum PAM) und in den 5 Nukleotiden vor dem PAM hingegen werden nicht toleriert und es kommt zu keinem Cas9-induzierten Doppelstrangbruch [211,212]. Grundsätzlich wird die Wahrscheinlichkeit für off-targets ab einem Score von 50 als niedrig eingestuft, was die gRNAs 1, 5, 6 und Luc als sehr gute Kandidaten identifiziert. Die gRNAs 2, 3 und 4 wurden dennoch getestet, da sie an für die virale Transkription essentiellen Bereichen binden (Kernpromotor; Abbildung 32).

Um zu überprüfen, ob die entworfenen gRNAs eine Inhibition der HIV Replikation hervorrufen können, wurden sie nach dem Schema in Abbildung 12 getestet. Jede gRNA wurde in drei verschiedene Plasmide kloniert, die sowohl für Cas9 als auch für die gRNA kodieren. Die Plasmide unterscheiden sich in der Verwendung des Pol III Promotors, der für die gRNA Transkription eingesetzt wird (H1, U6, 7SK). Unter der Verwendung des H1 Promotors für die Transkription der gRNAs kommt es zu den schwächsten Effekten auf die HIV Produktion, was zeigt, dass der H1 Promotor keine ausreichende Transkription der gRNA gewährleistet (Abbildung 36A). Sowohl Konstrukte, die den U6 Promotor verwenden, als auch die Verwendung des 7SK Promotors führen zu starken Effekten auf die HIV Expression (Abbildung 36B, C). Es ist zu beobachten, dass gRNAs 1, 3, 4 und 5 zu einer deutlichen Verringerung der HIV Produktion führen. Guide RNA 2 und 6 hingegen sind trotz einer 100%igen Übereinstimmung mit der HIV Sequenz, nicht in der Lage eine Inhibierung der HIV Replikation hervorzurufen. Insgesamt lässt sich festhalten, dass es wichtig ist *in silico* entworfene gRNAs auf ihre Fähigkeit Genomeditierungen hervorzurufen, zu testen. Außerdem zeigt sich, dass die Verwendung von verschiedenen Pol III Promotoren unterschiedliche Effekte auf die Transkription haben kann, was sich letztendlich in der Effektivität der Genomeditierung zeigt.

Obwohl die Ergebnisse für die Verwendung des U6 bzw. des 7SK Promotors ähnlich waren, wurde im Anschluss mit dem 7SK Promotor weitergearbeitet. Vorangegangene Studien die die Expression von siRNAs in Mäusen untersucht haben, konnten zeigen, dass der U6 Promotor wesentlich stärker ist als andere Pol III Promotoren. Die starke siRNA Expression führte allerdings zu toxischen Effekten vor allem in der Leber. Die toxischen Effekte konnten letztendlich auf Elemente des RNAi Pathways zurückgeführt werden, dennoch zeigen die Experimente, dass die starke Expression von externen Transgenen Nebeneffekte haben kann [141,213,214]. Außerdem wurde gezeigt, dass die Wahrscheinlichkeit von off-target Effekten aufgrund von CRISPR/Cas9 abnimmt, wenn das CRISPR/Cas9 System weniger stark in der Zielzelle exprimiert wird [215]. Da der 7SK Promotor, als schwächerer Promotor,

dennoch die gleichen Ergebnisse erzielen konnte, wie der U6 Promotor, wurde dieser im weiteren Verlauf der Arbeit verwendet.

Als gRNAs, die unter der Kontrolle des 7SK Promotors exprimiert werden, wurden gRNA1 und gRNA5 ausgewählt. Beide erzielten zum einen eine starke Reduktion der HIV Produktion und zum anderen weisen beide eine geringe Wahrscheinlichkeit für off-targets auf.

4.3.2.2 Einführung von inhibierenden Mutationen in astrozytären Proviren durch den Einsatz von AAV9P1-CRISPR/Cas9

Die unter Abschnitt 3.4.2.3 identifizierten Promotor-gRNA Kombinationen wurden benutzt um AAV9P1 Vektoren zu produzieren, die sowohl für Cas9 als auch für eine gRNA kodieren. Die Transduktion von differenzierten HNSC.LatGFP1.2 Kulturen mit AAV9P1_gRNA1, AAV9P1_gRNA5 oder beiden Vektoren führte nach der Reaktivierung der Proviren durch TNF- α zu einer signifikanten Verringerung der HIV Expression. Diese Verringerung konnte im Vergleich zu nicht-transduzierten, aber reaktivierten Zellen sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene festgestellt werden. Interessanterweise konnten weder die Transkripte noch der Anteil an GFP-exprimierenden Zellen auf Hintergrundlevel verringert werden und auch die Kombination von beiden AAV9P1 Vektoren führte zu keiner verstärkten Reduktion der HIV Expression. Ein Grund hierfür könnte sein, dass in verschiedenen Studien gezeigt wurde, dass die Bindung von Cas9 an die Ziel-DNA unter anderem durch epigenetische Modifikationen beeinflusst wird. So konnte nachgewiesen werden, dass Cas9 bevorzugt an Euchromatin bindet [216,217]. Außerdem wurde für *in vivo* Applikationen gezeigt, dass hohe Mengen an CpG Methylierungen an der Ziel-DNA die Cas9 Bindung hemmen, gleichzeitig zeigt allerdings eine andere Studie, dass dies für *in vitro* Experimente nicht gilt [127,217]. Trotzdem sollte bedacht werden, dass sich HIV Latenz bevorzugt an transkriptionell inaktiven Bereichen (Heterochromatin oder Hypermethylierung) bildet. Somit besteht durchaus die Möglichkeit, dass es eine Subpopulation an HNSC.LatGFP1.2 Zellen gibt, die nicht durch CRISPR/Cas9 erreicht werden kann. Auch in anderen Studien, in denen CRISPR/Cas9 benutzt wurde, um latente HIV Proviren zu inaktivieren wurde keine vollständige Inhibierung der HIV Expression erreicht [88,120,122]. Dieser Umstand spricht dafür, dass man die Behandlung von latent infizierten Zellen durch Genomeditierungssystemen mit dem Einsatz von anderen HIV-Inhibitoren (Didehydro-Cortistatin A; 1.1.5.2) kombinieren könnte, um eine vollständige Inaktivierung des Provirus zu erreichen.

Kaminski *et al.*, 2016 konnten belegen, dass die Inhibierung der HIV Reaktivierung in latent infizierten, proliferierenden CD4-positiven T-Lymphozyten, die mit CRISPR/Cas9 behandelt worden waren, durch einen Verlust an HIV Proviren begründet war. Die in dieser Studie verwendeten gRNAs binden, genauso wie gRNA1 und gRNA5, sowohl im 5' LTR als auch

im 3' LTR des Provirus. Um zu überprüfen, ob die Effekte auf die HIV Reaktivierung in HNSC.LatGFP1.2 Kulturen durch einen Verlust an Proviren erklärt werden kann, wurde eine absolute Provirusquantifizierung durchgeführt. Abbildung 39 zeigt, dass die Anzahl an Proviren in AAV9P1-CRISPR/Cas9 transduzierten Kulturen nicht niedriger ist als in Kontrollkulturen. Somit kam es weder zu einem Verlust an Proviren, noch an latent infizierten HNSC.LatGFP1.2 Zellen. Während ein Verlust an Proviren toleriert werden könnte, wäre ein Verlust an latent infizierten Astrozyten von Nachteil in *in vivo* Applikationen, da ein Verlust an ZNS Zellen grundsätzlich vermieden werden sollte.

Die genaue Analyse der durch CRISPR/Cas9 hervorgerufenen Mutationen in den transduzierten Kulturen zeigt, dass die Transduktion mit einem AAV9P1-CRISPR/Cas9 Vektor zu verschiedenen Indel Mutationen führt. Die Mutationen sind wie zu erwarten kurz nach dem PAM zu finden. Sobald Kulturen mit beiden AAV9P1-CRISPR/Cas9 Vektoren transduziert wurden, entstehen statt Indel Mutationen weitläufige Deletionen, die den kompletten Bereich zwischen den gRNA Bindestellen umspannen. Somit wurden in diesen Kulturen beide NF- κ B-Bindestellen, alle drei SP1-Bindestellen und die TBP-Bindestelle entfernt, was bedeutet, dass alle für die HIV Transkription essentiellen Bestandteile entfernt wurden (Abbildung 32).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Langzeitexpression von Cas9 und einer gRNA in CD4-positiven T-Lymphozyten zur Entstehung von resistenten HIV Populationen führt. Es wurde nachgewiesen, dass die durch das NHEJ hervorgerufenen Indel Mutationen in der Lage waren Resistenzmutanten zu erzeugen, welche nicht mehr durch CRISPR/Cas9 editiert werden konnten. Die Entstehung von solchen Resistenzmutanten trat verspätet auf, wenn das CRISPR/Cas9 System stark konservierte Bereiche des HIV Provirus mutierte [218–220]. Die Gefahr einer Bildung von Resistenzmutanten dürfte durch den gleichzeitigen Einsatz von gRNA1 und gRNA5 in dieser Arbeit geringfügig sein, da beide gRNAs stark konservierte Bereiche im HIV Provirus binden. Zudem kann es in Kulturen, in denen die oben beschriebenen Deletionen auftreten, zu keiner HIV Expression mehr kommen und somit auch nicht zur Entstehung von Resistenzmutanten. Es zeigt sich also, dass, auch wenn kein stärkerer Effekt auf die Reaktivierung zu beobachten ist, der Einsatz von zwei gRNAs von Vorteil ist, um Resistenzmutanten vorzubeugen.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass AAV9P1 in der Lage ist das Genomeditierungssystem CRISPR/Cas9 in latent infizierte Astrozyten einzubringen und das CRISPR/Cas9 sich sehr gut dafür eignet HIV Proviren zu inaktivieren, während gleichzeitig ein Verlust an Zellen vermieden wird.

5 Zusammenfassung

Astrozyten, welche eine Vielzahl an Schlüsselfunktionen im ZNS erfüllen, stellen ein wichtiges HIV-Reservoir im Menschen dar. HIV etabliert eine latente Infektion in Astrozyten und trägt somit zur Persistenz des Virus in Patienten bei. Darüberhinaus kann die HIV Infektion von Astrozyten das Auftreten von neurologischen Defiziten in HIV-infizierten Personen begünstigen. Zukünftige Strategien zur Behandlung von HIV Patienten sollten daher auch die Behandlung von infizierten Astrozyten beinhalten. Da die momentan etablierte medikamentöse Behandlung von Patienten (cART) nur unzureichend Zellen des ZNS erreicht, wurde in dieser Arbeit der Ansatz verfolgt einen viralen Vektor zu identifizieren, der in der Lage ist effektiv Astrozyten zu transduzieren und der HIV-inhibierende Sequenzen in Astrozyten einbringen kann.

In dieser Arbeit wurde der AAV (Adeno-assoziiierter Virus) Vektor AAV9P1 aus einer AAV Bibliothek heraus identifiziert, die sowohl Wildtyp-AAVs als auch synthetische Vektoren enthielt. AAV9P1 war in der Lage Astrozyten effektiv zu transduzieren und etablierte gleichzeitig eine langanhaltende Transgenexpression. AAV9P1 war zudem in der Lage auch in gemischten Zellpopulationen (Organoide) bevorzugt Astrozyten zu transduzieren. Außerdem konnte die Astrozyten-spezifische Transduktion durch AAV9P1 weiter moduliert werden, indem AAV9P1 mit dem zellspezifischen Promotor gfaABC₁D (=AAV9P1_gfaABC₁D) kombiniert wurde. Zelllinien, die aus Geweben außerhalb des ZNS stammen, zeigten nach der Transduktion mit AAV9P1_gfaABC₁D keine Transgenexpression.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass auch HIV Reservoir in Astrozyten durch das Genomeditierungssystem CRISPR/Cas9 inhibiert werden können. Hierbei wurde CRISPR/Cas9 durch AAV9P1 in ein astrozytäres HIV-Latenzmodell eingebracht, was zur Folge hatte, dass die Reaktivierung des HIV Provirus erfolgreich verhindert werden konnte. Es zeigt sich also, dass AAV9P1 ein potenter Vektor zur Transduktion von Astrozyten ist und dass es möglich ist HIV Proviren in Astrozytenkulturen durch den AAV9P1-vermittelten Transport von HIV-inhibierenden Sequenzen still zu legen.

In zukünftigen Arbeiten soll das Transduktionsverhalten von AAV9P1 in Mausmodellen erforscht werden. Vor allem die Frage, ob AAV9P1 auch in *in vivo* Experimenten in der Lage ist Astrozyten effektiv zu transduzieren ist hierbei von Bedeutung.

6 Anhang

6.1 Puffer

Name	Rezeptur
15% Iodixanol Lösung	25% (v/v) Iodixanol (60% Stammlösung) 75% (v/v) PBS-MK-NaCl
25% Iodixanol Lösung	42% (v/v) Iodixanol (60% Stammlösung) 58% (v/v) PBS-MK
40% Iodixanol Lösung	66% (v/v) Iodixanol (60% Stammlösung) 34 % (v/v) PBS-MK
AAV Lyse Puffer	50 mM Tris-HCl (pH (8,5) 150 mM NaCl pH auf 8,5 einstellen
PBS	140 mM NaCl 5,4 mM KCl 9,7 mM Na ₂ HPO ₄ x 2xH ₂ O 2 mM KH ₂ PO ₄ pH auf 7,4 einstellen
PBS-MK	1x PBS 1 mM MgCl ₂ 2,5 mM KCl
PBS-MK-NaCl	1x PBS-MK 1 M NaCl
Permeabilisierungspuffer	1x PBS 1% (w/v) BSA 0,2% (v/v) Triton-x
Quenching Lösung	1x PBS 50 mM NH ₄ Cl 20 mM Glycin
TAE Puffer (50x)	2 M Tris-Acetat 100 mM EDTA 10 mM Tris-HCl
TE Puffer	10 mM Tris 1 mM EDTA pH auf 8,0 einstellen

6.2 Chemikalien und Enzyme

Chemikalie	Hersteller/Lieferant
2-log DNA ladder	New England Biolabs
ACK-Lysepuffer	Life Technologies
Agar	Sigma-Aldrich
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Roth
Ampicillin (Stammlösung 50 µg/ml)	Roth
Antibiotikum/Antimykotikum (100x; Anti-Anti)	Gibco
Benzonase	Merck
BSA	Sigma-Aldrich
DAPI	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Roth
DMEM (Glutamax-I, 4,5 g/l Glucose, Pyruvat)	Gibco
DMEM F-12	Gibco
DMSO	AppliChem
DNase	Qiagen
dNTPs	Thermo Fisher Scientific
EDTA	Sigma-Aldrich
EGF	PeproTech
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Roth
FGF-2	PeproTech
Ficoll	Biochrom
FKS	Gibco
GoTaq Polymerase	Promega
GoTaq Puffer™ (5x)	Promega
HCl (2M)	Sigma-Aldrich
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich

Humanes Interleukin-2 (hIL-2)	Roche
Iodixanol	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Roth
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Roth
KH_2PO_4	Sigma-Aldrich
Light Cycler [®] 480 SYBR Green I Master	Roche
MgCl_2	Sigma-Aldrich
Mowiol	Roth
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{xH}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich
NaCl	Sigma-Aldrich
NaOH	Sigma-Aldrich
Natriumpyruvat (100x)	Gibco
NH_4Cl	Sigma-Aldrich
Nuklease-freies Wasser (MilliQ; Filtriert durch Millipore-Anlage)	Millipore Water System
PEI	Santa Cruz Biotechnology
PenStrep	Gibco
PFA	Sigma-Aldrich
Pfu Polymerase	Thermo Fisher Scientific
Pfu Puffer (10x)	Thermo Fisher Scientific
Phytohemagglutinin (PHA)	Biochrom
Poly-L-Lysine (0,1% in Wasser)	Sigma-Aldrich
Qubit [™] dsDNA BR Assay Kit	Invitrogen
Rapid Ligation Puffer (2x)	Thermo Fisher Scientific
Restriktionsenzyme und Puffer	New England Biolabs
SOC Medium	Invitrogen
T4 DNA Ligase und Puffer (10x)	Thermo Fisher Scientific
T7 Endonuklease	New England Biolabs

TNF- α	Sigma-Aldrich
Tris	Sigma-Aldrich
Triton-X 100	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA Lösung (0,05% Trypsin, 0,02% EDTA in PBS ohne Ca^{2+} , Mg^{2+})	Gibco
Trypton	Sigma-Aldrich
VLE-RPMI-1640 (Very-low-endotoxin Roswell Park Memorial Institute Medium 1640)	Biochrom
Xtreme-Gene TM Transfection Reagent	Roche Diagnostics
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich

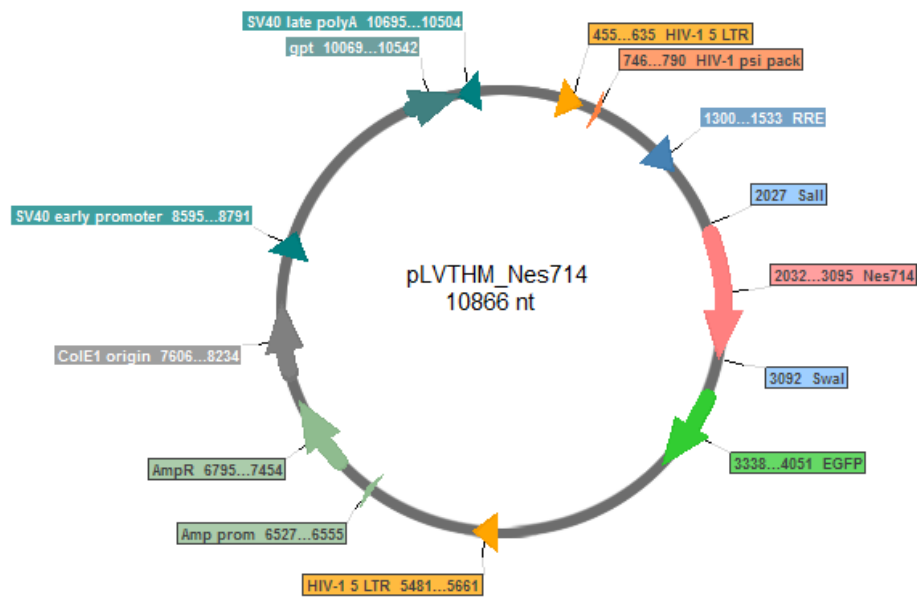
6.3 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller/Lieferant
4itude Frame Star 480 RT-PCR Platte	Surrey
8,9 ml Polyallamer OptiSeal Zentrifugenröhrchen	Beckman Coulter
96-well Zellkulturplatte, μ -clear Boden, Wand schwarz	Greiner Bio-One
CELLSTAR® dish (15 cm)	Greiner Bio-One
Combitips 1-10 ml für Handystep	Eppendorf
Deckgläschen, rund Ø 12 mm	Roth
Eppendorf Reaktionsgefäße 0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf
FACS Röhrchen	Falcon
Falcon® 15 ml, 50 ml	BD Bioscience
Fast-Read 102 Zählkammer	Biosigma
Gestopfte Spitzen (10-1000 μ l)	Eppendorf
Kanülen	Sterican Braun
Nunc Cryo Tubes™ Vials	Nunc International
Objektträger, 76 x 26 mm, 1 mm Stärke	Roth
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
Pipetten (1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One
Pipettenspitzen (10-1000 μ l)	Eppendorf
QIAshredder	Qiagen
Spritzen	BD Syringe
Zellkulturflaschen in verschiedenen Größen (T75, T175)	Sarstedt
Zellkulturschalen in verschiedenen Größen (96-, 48-, 24-, 12-, 6-well)	Greiner Bio-One
Zellschaber	Sarstedt

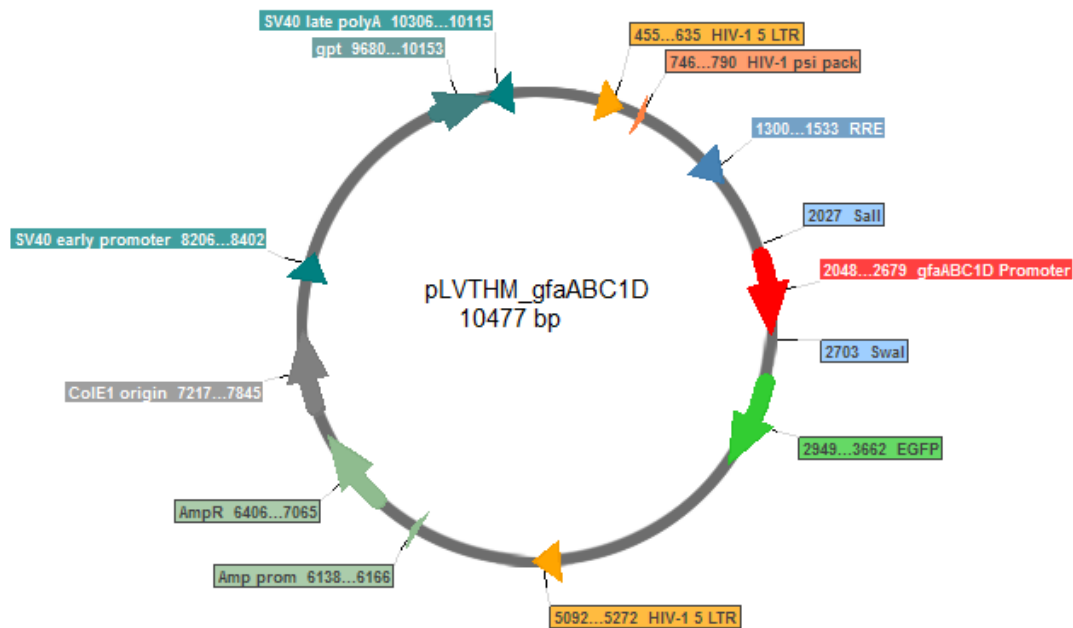
6.4 Geräte

Name	Hersteller/Lieferant
Accu-Jet® pro	Brand
Brutschrank für Bakterien	Memmert
Brutschrank für Zellkultur	Hereaus
ChemiDoc Geldokumentationsanlage	BioRad
Eppendorf Pipettenset „Research“	Eppendorf
Eppendorf Zentrifuge 5415R	Eppendorf
FACSCanto II™	BD Biosciences
Gelelektrophorese Kammer B1A	Owl Separation Systems Inc.
HandyStep Electronic	Brand
HeraSafe Laminar Flow Bank	Hereaus
Hettich Rotana 460 R Zentrifuge	Andreas Hettich Zentrifugen
Infinite M200 Plattenleser	Tecan Group
Laboson 200 Wasser- und Ultraschallbad	Bender & Hobein
Light Cycler® 480 II 96	Roche
MasterCycler Gradient	Eppendorf
Multispeed Vortex	Kisker Biotech
Multitron Schüttelinkubator	Infors
NanoDrop 2000 Spectrophotometer	Thermo Scientific
Nikon TiE mit Perkin Elmer UltraView Vox System	Nikon, Perkin Elmer
PowerPac Basic	BioRad
PrimoVert Mikroskop	Zeiss
Qubit 2.0	Invitrogen
Thermomixer 5436	Eppendorf
Ultrazentrifuge	Beckman Coulter

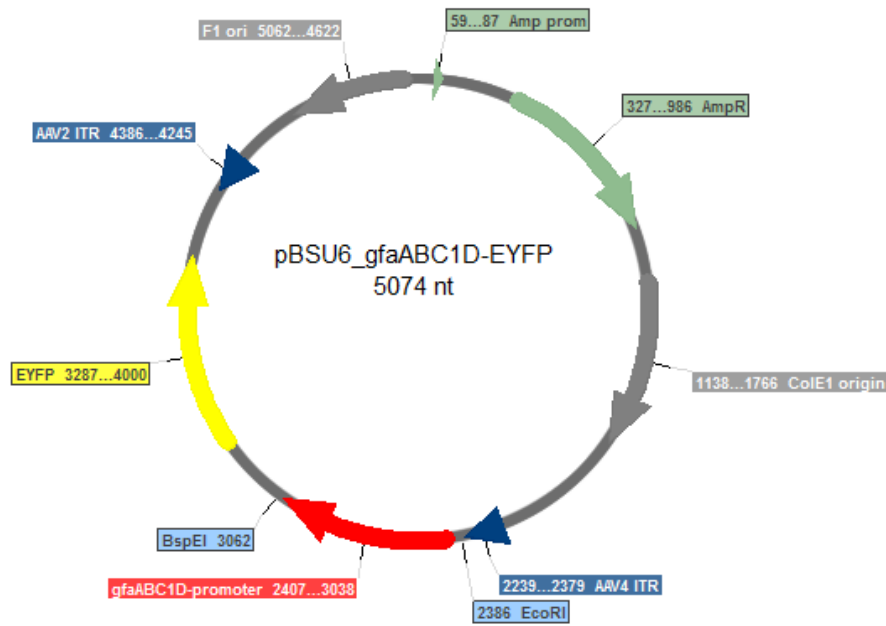
6.5 Plasmidkarten



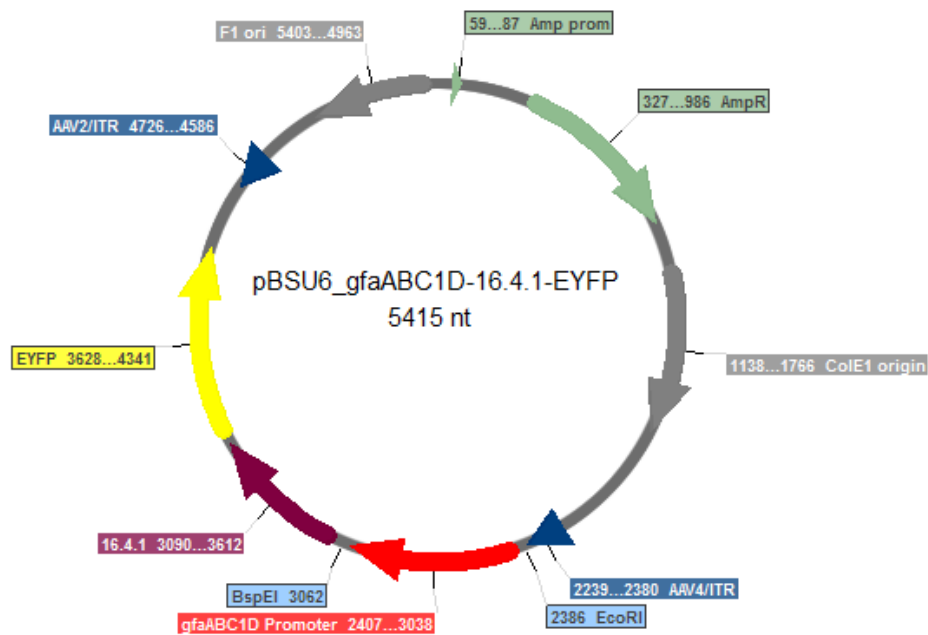
Plasmidkarte zu pLVTHM_Nes714; eine genaue Beschreibung ist in Abschnitt 2.1.5 zu finden.



Plasmidkarte zu pLVTHM_gfaABC_{1D}; eine genaue Beschreibung ist in Abschnitt 2.1.5 zu finden.



Plasmidkarte zu pBSU6_gfaABC₁D-EYFP; eine genaue Beschreibung ist in Abschnitt 2.1.5 zu finden.



Plasmidkarte zu pBSU6_gfaABC₁D-16.4.1-EYFP; eine genaue Beschreibung ist in Abschnitt 2.1.5 zu finden.

6.6 Protokolle zur Herstellung von hiPSCs und davon abgeleiteten Zellen

Reprogrammierung von primären BJ Fibroblasten zu hiPSCs

Zuerst wurden $2,5 \cdot 10^5$ NuFF3-RQ humane Newborn Vorhaut Feeder-Fibroblasten (GlobalStem) pro well einer 6-well Platte ausgesät. Als Medium wurde advanced MEM (Thermo Fisher Scientific) verwendet, das mit 5% HyClone FKS (GE Healthcare) und 1% MEM NEAA in GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific) versetzt wurde. An Tag 1 wurden BJ Fibroblasten (ATCC) mit zwei verschiedenen Zellzahlen ($2 \cdot 10^4$ /well oder $4 \cdot 10^4$ /well) auf die NuFF3-RQ Zellen gesät. An Tag 2 wurde das Medium zu Pluriton Reprogramming Medium (Stemgent) gewechselt, welches mit 500 ng/ml carrier-free B18R rekombinanten Protein (Stemgent) versetzt war. Zwischen den Tagen 3 und 18 wurden die Zellen täglich mit einem mmRNA Mix (*engl.* modified mRNA), der aus mRNAs für die Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2, KLF4, LIN28 und c-Myc bestand (Stöchiometrisches Verhältnis von 3:1:1:1:1), transfiziert. Pro well einer 6-well Platte wurden für die Transfektion 46 μ l Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Thermo Fisher Scientific), 7,5 μ l Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific) und der mmRNA Mix vermischt. Der Ansatz wurde für 15 min bei RT inkubiert und im Anschluss für 4 h auf die Zellen gegeben. Nach 4 h wurde das Medium gewechselt. Der mmRNA Mix wurde vom RNA CORE des Houston Methodist Krankenhauses bereitgestellt und die mRNAs enthielten folgende Modifikationen: 5-Methyl CTP, Pseudo-UTP, ARCA cap und eine 150 nt poly-A-Sequenz. Die ersten Kolonien an hiPSCs waren zwischen den Tagen 12 und 15 nach der Transfektion zu sehen. An Tag 16 wurde das Medium für 5 Tage zu STEMPRO hESC SFM (Thermo Fisher Scientific) gewechselt. Als nächstes wurden die hiPSC Kolonien durch Behandlung (37°C für 40 min) mit 2 mg/ml Collagenase, Type IV (Thermo Fisher Scientific) in DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific) geerntet. Die hiPSCs wurden auf γ -bestrahlte MEFs (*engl.* mouse embryonic fibroblasts) gesät und für 10 weitere Passagen in STEMPRO Medium kultiviert. Im Anschluss wurden die hiPSCs auf Matrigel-beschichtete (Corning BioLogica) Platten übertragen und in mTeSR1 Medium (StemCell Technologies) kultiviert.

Differenzierung von hiPSCs in neurale Progenitorzellen, kortikale Neuronen und Astrozyten

Die Differenzierung von hiPSCs in neurale Progenitorzellen (NPs) wurde wie in Chambers *et al.*, 2012 [221] durchgeführt. HiPSCs wurden durch den Einsatz von Accutase (Sigma-Aldrich) vereinzelt und im Anschluss wurden 7,104 Zellen pro cm^2 auf Geltrex-behandelte Platten (Life Technologies) ausgesät. Als Medium wurde mTeSR1 Medium (StemCell

Technologies) verwendet. An Tag 1 wurde das mTeSR1 Medium durch N2/B27 Medium ersetzt. N2/B27 Medium besteht aus DMEM/F12 (Gibco), 1x N2 Supplement A(Gibco), 5 µg/ml Insulin (Life Technologies), 1mM L-Glutamin (Gibco), 100 µM nicht-essentielle Aminosäuren (Sigma-Aldrich), 100 µM β-Mercaptoethanol (Gibco), 50 U/ml Penicillin + 50 mg/ml Streptomycin (Gibco), Neurobasal Medium (Life Technologies), B27 mit Vitamin A (Gibco), welches mit LDN (ENZO Life Sciences) versetzt wurde und SB431542 (Miltenyi). Das Medium wurde für die kommenden 10 Tage täglich gewechselt. An Tag 14 wurden die Rosetten aus neuronalen Epithelzellen auf Poly-Ornithin (Sigma-Aldrich) und Lamin (Sigma-Aldrich) behandelte Platten ausgesät. Als Medium wurde N2/B27, welches mit 100 ng/ml FGF-2 (Miltenyi) versetzt wurde, verwendet. Vor weiteren Experimenten wurden die Zellen eine Woche in Kultur gehalten.

Um NPs in kortikale Neuronen zu differenzieren, wurde das Medium zu N2/B27 Medium, welches mit 200 µM Ascorbinsäure (Sigma-Aldrich) und 20 ng/ml BDNF (Miltenyi) versetzt war, gewechselt. Die Zellen wurden für die Differenzierung 40 Tage in diesem Medium kultiviert.

Um NPs in Astrozyten zu differenzieren, wurde das Medium zu N2/B27 Medium, welches mit 100 ng/ml EGF (Miltenyi) und 100 ng/ml FGF-2 versetzt war, gewechselt. Die Zellen wurden 90 Tage in diesem Medium kultiviert und im Anschluss wurde das Medium zu N2/B27 Medium, welches mit 100 ng/ml EGF und 20 ng/ml CNTF (Miltenyi) versetzt war, gewechselt. Die Zellen wurden für weitere 181 Tage in dem letzten Medium kultiviert.

Differenzierung von hiPSCs in Organoide

Die Differenzierung von hiPSCs zu Organoiden wurde entsprechend dem Protokoll von Lancaster *et al.*, 2013 [165] durchgeführt. HiPSCs wurden durch den Einsatz von Accutase vereinzelt und anschließend in mTeSR1 Medium in low-attachment Platten ausgesät bis sie „embryonic bodies“ (EB) bilden. Die Zellen wurden kultiviert bis die EBs einen Durchmesser von 500-600 µm erreicht hatten. Als nächstes wurden die EBs in N2/B27 Medium überführt und solange darin kultiviert bis sich pseudostratifiziertes Epithelgewebe gebildet hatte. An diesem Punkt wurden die EBs auf Matrigel-behandelte Platten übertragen und in N2/B27 Medium, welches ab Tag 16 mit Vitamin A versetzt war, für 60 Tage kultiviert. Während dieser Zeit wurden die Platten auf einem Orbitalschüttler bei 85 Rotationen pro Minute inkubiert. Um eine Anreicherung von Astrozyten zu erreichen wurde 20 ng/ml CNTF zwischen den Tagen 70 und 77 hinzugefügt.

6.7 Protokoll zur Isolierung von PBMCs

Um humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes zu isolieren, wurde mit „Buffy Coats“ des bayrischen Roten Kreuzes gearbeitet. Jede Probe enthielt ca. 25 ml Blut mit CPD-Antikoaluanzen. Die Blutproben wurden mit 1x PBS auf 100 ml aufgefüllt. Im Anschluss wurde ein 50 ml Reagenzgefäße mit 15 ml Ficoll-Lösung versehen und jeweils 25 ml des Blut-PBS Gemisches wurden vorsichtig auf die Ficoll-Lösung geschichtet. Die Proben wurden bei 900 g für 20 min ohne Bremse zentrifugiert. Der weiße Lymphozyten/Monozytenring wurde vorsichtig abgenommen und mit den restlichen des gleichen Spenders vereinigt. Die Lösung wurde auf 50 ml mit 1x PBS aufgefüllt und erneut bei 500 g für 10 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Zellpellet in 2 ml ACK-Lysepuffer resuspendiert und für 2 min bei RT inkubiert. Durch diesen Schritt wurden restliche Erythrozyten lysiert. Die Lösung wurde auf 50 ml mit 1x PBS aufgefüllt und bei 300 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in 60 ml Zellkulturmedium für Suspensionszellen (Tabelle 3) aufgenommen. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen zur Stimulierung in frischem Medium, das mit 20 U/ml hIL-2 und 1 µg/ml PHA versetzt war, aufgenommen.

7 Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
aa	Aminosäure
AAV	Adeno-assoziierte Viren
AdV	Adenovirus
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ANI	Asymptomatic neurocognitive impairment
AP-1	Activator protein 1
APOBEC3	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3
ART	Anti-retroviral therapy
BIV	Bovines Immundefizienz Virus
BMEC	Brain microvascular endothelial cells
bp	Basenpaar
BSA	Bovine serum albumine, Rinderalbumin
bzw	beziehungsweise
ca.	circa
Cap	Capsid protein; Kapsidprotein
cART	combined anti-retroviral therapy
Cas9	CRISPR associated 9
CCL2	CC-chemokine ligand 2; CC-Chemokinligand 2
CCR5	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5
CD4	Cluster of Differentiation 4-Rezeptor
CD9	Cluster of Differentiation 9-Rezeptor
cDNA	complementary DNA
CFP	Cyan fluorescence protein
CDK9	Cyclin-dependent kinase 9; Cyclin-abhängige kinase 9
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalovirus
Cp	Crossing point
CPD	Citrate Phosphate Dextrose Solution
Cre	Cyclization recombination
CRF	circulating recombinant forms
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CRM-1	Chromosomal maintenance 1
CSF	Cerebrospinal fluid
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
diff	differenziert
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	double-strand DNA; Doppelstrang-DNA
E2A	Early protein 2A
E4	Early protein 4
EB	Embryoid body

E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
Env	Envelope; Hüllproteine
EtOH	Ethanol
EYFP	Enhanced yellow fluorescence protein
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
Fam21	Genfamilie mit Sequenzähnlichkeit 21
FDA	Food and Drug Administration
FGF-2	Fibroblast growth factor 2
FGFR1	Fibroblast growth factor receptor 1
FIV	Felines Immundefizienz Virus
FIV	felines Immundefizienzvirus
FKS	Fötales Kälber Serum
FSC	Forward Scatter; Vorwärtstreulicht
fw	forward
Gag	Gruppenspezifische Antigene
gDNA	genomische DNA
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GFP	Green fluorescence protein
gp120	Glykoprotein 120
gp160	Glykoprotein 160
gp41	Glykoprotein 41
gRNA	guide RNA
GU	Genomic Units
HAD	HIV-associated dementia
HAND	HIV-associated neurocognitive disorder
HCl	Salzsäure
HDR	Homology-directed repair
HGFR	Hepatocyte growth factor receptor
hIL-2	humanes Interleukin 2
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HSV	Herpes Simplex Virus
HSPG	Heperansulfat Proteoglykan
HTLV	Humanes T-lymphotropes Virus
IN	Integrase
Indel	Insertion/Deletion
inkl.	inklusive
ITR	Inverted terminal repeat
IV	Intravenös
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LacZ	Gen, das für das Enzym β -Glaktosidase kodiert
LamR	Laminin Rezeptor
LB	Luria Bertani

LRA	Latency reversing agent
LTR	Long terminal repeat
Luc	Luciferase
MCS	Multi-cloning site
MHC	Major histocompatibility complex
miRNA	micro RNA
MND	Mild neurocognitive impairment
MOI	Multiplicity of Infection
mRNA	messenger RNA
MW-CO	Molekulargewicht-Cut off
N	Normalität
Nef	Negativ Faktor
NF-AT1	Nuclear factor of activated T-cells
NF-IL6	Nuclear factor for IL-6 expression
NF-kB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
ng	Nanogramm
NGS	Next Generation Sequencing
NHEJ	Non-homologous end joining
NNRTI	Nicht-Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
NP	Neuronale Progenitorzellen
NRTI	Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
nt	Nukleotid
PAM	Protospacer Adjacent Motif
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PHA	Phytohaemagglutinin
PI	Pearsons Correlation Coefficient
PIC	Pre-integration complex
Pol	Polyprotein
Pol II	RNA Polymerase II
Pol III	RNA Polymerase III
PR	Protease
prol	proliferierend
P-TEFB	Positiver Transkriptions-Elongationsfaktor B
qPCR	Quantitative PCR
Rep	Regulatory protein; regulatorisches Protein
Rev	Regulator of expression of virion proteins
Risp	Rev-interacting HIV-suppressor proteins; Rev-interagierende HIV-inhibierende Proteine
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies

RRE	Rev responsive element
RT	Raumtemperatur
rv	reverse
SAHA	N-Hydroxy-N'-phenyloctandiamid
SAMHD1	SAM domain and HD domain-containing protein 1
scAAV	self-complementary AAV
shRNA	Short-hairpin RNA
siRNA	Short-interfering RNA
SIV	Simianes Immundefizienz Virus
SMN-1	Survival of motor neuron 1
Sox2	SRY (sex determining region Y)-box 2
SP1	Specificity protein 1
ssAAV	single-strand AAV
SSC	Side Scatter; Seitwärtsstreulicht
ssDNA	single-strand DNA; Einzelstrang-DNA
ssRNA	single-strand RNA; Einzelstrang-RNA
TAE	Tris-Acetate-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAR	Trans-activation response element
Tat	Transactivator of transcription
TBP	TATA box binding protein
Temp	Temperatur
TFE-3	Transcription factor E3
Tm	Schmelztemperatur
TNF-alpha	Tumor-necrosis factor alpha
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol
U	Unit
u.a.	unter anderem
U3/U5	Untranslated region 3/ Untranslated region 5
USF-1	Upstream stimulatory factor 1
UV	Ultraviolettes Licht
VA	Viral associated RNA
Vgl.	Vergleich
Vif	Virionen Infektivitätsfaktor
VLE-RPMI-1640	Very-low-endotoxin Roswell Park Memorial Institute Medium 1640
Vpr	Virales Protein R
Vpu	Virales protein U
WHO	World Health Organization
Wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

8 Referenzen

- [1] Gottlieb, M.S., Schroff, R., Schanker, H.M., Weisman, J.D., Fan, P.T., Wolf, R.A., et al. (1981) Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *The New England Journal of Medicine*. 305 (24), 1425–1431.
- [2] Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., et al. (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science (New York, N.Y.)*. 220 (4599), 868–871.
- [3] Gallo, R.C., Sarin, P.S., Gelmann, E.P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V.S., et al. (1983) Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science (New York, N.Y.)*. 220 (4599), 865–867.
- [4] Coffin, J., Haase, A., Levy, J.A., Montagnier, L., Oroszlan, S., Teich, N., et al. (1986) Human immunodeficiency viruses. *Science (New York, N.Y.)*. 232 (4751), 697.
- [5] Nyamweya, S., Hegedus, A., Jaye, A., Rowland-Jones, S., Flanagan, K.L., and Macallan, D.C. (2013) Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis: Comparisons between HIV-1 and HIV-2 infection. *Reviews in Medical Virology*. 23 (4), 221–240.
- [6] Hirsch, V.M., Olmsted, R.A., Murphey-Corb, M., Purcell, R.H., and Johnson, P.R. (1989) An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature*. 339 (6223), 389–392.
- [7] Huet, T., Cheynier, R., Meyerhans, A., Roelants, G., and Wain-Hobson, S. (1990) Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature*. 345 (6273), 356–359.
- [8] Sharp, P.M. and Hahn, B.H. (2011) Origins of HIV and the AIDS Pandemic. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 1 (1), a006841–a006841.
- [9] Gürtler, L.G., Hauser, P.H., Eberle, J., von Brunn, A., Knapp, S., Zekeng, L., et al. (1994) A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *Journal of Virology*. 68 (3), 1581–1585.
- [10] McCutchan, F.E. (2006) Global epidemiology of HIV. *Journal of Medical Virology*. 78 (S1), S7–S12.
- [11] Plantier, J.-C., Leoz, M., Dickerson, J.E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemée, V., et al. (2009) A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature Medicine*. 15 (8), 871–872.
- [12] Hemelaar, J., Gouws, E., Ghys, P.D., Osmanov, S., and WHO-UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterisation (2011) Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. *AIDS (London, England)*. 25 (5), 679–689.
- [13] Modrow, S., Falke, D., and Truyen, U. (2003) Molekulare Virologie. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg [u.a.].
- [14] Watts, J.M., Dang, K.K., Gorelick, R.J., Leonard, C.W., Bess Jr, J.W., Swanstrom, R., et al. (2009) Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. *Nature*. 460 (7256), 711–716.
- [15] Stoltzfus, C.M. (2009) Chapter 1. Regulation of HIV-1 alternative RNA splicing and its role in virus replication. *Advances in Virus Research*. 74 1–40.
- [16] Karn, J. and Stoltzfus, C.M. (2012) Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of HIV-1 Gene Expression. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2 (2), a006916–a006916.
- [17] Pereira, L.A. (2000) SURVEY AND SUMMARY A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. *Nucleic Acids Research*. 28 (3), 663–668.

- [18] Huang, L.M. and Jeang, K.T. (1993) Increased spacing between Sp1 and TATAA renders human immunodeficiency virus type 1 replication defective: implication for Tat function. *Journal of Virology*. 67 (12), 6937–6944.
- [19] Nabel, G. and Baltimore, D. (1987) An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature*. 326 (6114), 711–713.
- [20] Chan, D.C., Fass, D., Berger, J.M., and Kim, P.S. (1997) Core Structure of gp41 from the HIV Envelope Glycoprotein. *Cell*. 89 (2), 263–273.
- [21] Wyatt, R., Kwong, P.D., Desjardins, E., Sweet, R.W., Robinson, J., Hendrickson, W.A., et al. (1998) The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature*. 393 (6686), 705–711.
- [22] Earl, P.L., Moss, B., and Doms, R.W. (1991) Folding, interaction with GRP78-BiP, assembly, and transport of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *Journal of Virology*. 65 (4), 2047–2055.
- [23] Klasse, P.J. (2012) The molecular basis of HIV entry. *Cellular Microbiology*. 14 (8), 1183–1192.
- [24] Frankel, A.D. and Young, J.A. (1998) HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annual Review of Biochemistry*. 67 1–25.
- [25] Freed, E.O. (1998) HIV-1 Gag Proteins: Diverse Functions in the Virus Life Cycle. *Virology*. 251 (1), 1–15.
- [26] Romani, B. and Engelbrecht, S. (2009) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr: functions and molecular interactions. *The Journal of General Virology*. 90 (Pt 8), 1795–1805.
- [27] Kremer, M. and Schnierle, B.S. (2005) HIV-1 Vif: HIV's weapon against the cellular defense factor APOBEC3G. *Current HIV Research*. 3 (4), 339–344.
- [28] Das, S.R. and Jameel, S. (2005) Biology of the HIV Nef protein. *The Indian Journal of Medical Research*. 121 (4), 315–332.
- [29] Sundquist, W.I. and Kräusslich, H.-G. (2012) HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2 (7), a006924.
- [30] Connell, B.J. and Lortat-Jacob, H. (2013) Human Immunodeficiency Virus and Heparan Sulfate: From Attachment to Entry Inhibition. *Frontiers in Immunology*. 4.
- [31] Wilen, C.B., Tilton, J.C., and Doms, R.W. (2012) HIV: Cell Binding and Entry. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2 (8), a006866–a006866.
- [32] Whitcomb, J.M. and Hughes, S.H. (1992) Retroviral Reverse Transcription and Integration: Progress and Problems. *Annual Review of Cell Biology*. 8 (1), 275–306.
- [33] Hu, W.-S. and Hughes, S.H. (2012) HIV-1 reverse transcription. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2 (10),.
- [34] Delelis, O., Carayon, K., Saïb, A., Deprez, E., and Mouscadet, J.-F. (2008) Integrase and integration: biochemical activities of HIV-1 integrase. *Retrovirology*. 5 (1), 114.
- [35] Pugliese, A., Vidotto, V., Beltramo, T., Petrini, S., and Torre, D. (2005) A review of HIV-1 Tat protein biological effects. *Cell Biochemistry and Function*. 23 (4), 223–227.
- [36] Zhu, Y., Pe'ery, T., Peng, J., Ramanathan, Y., Marshall, N., Marshall, T., et al. (1997) Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 tat transactivation in vitro. *Genes & Development*. 11 (20), 2622–2632.
- [37] Malim, M.H., Hauber, J., Le, S.-Y., Maizel, J.V., and Cullen, B.R. (1989) The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature*. 338 (6212), 254–257.
- [38] Shafer, R.W. and Vuitton, D.A. (1999) Highly active antiretroviral therapy (HAART) for the treatment of infection with human immunodeficiency virus type 1. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*. 53 (2), 73–86.
- [39] Wang, Y., Lv, Z., and Chu, Y. (2015) HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity. *HIV/AIDS - Research and Palliative Care*. 95.
- [40] Shafer, R.W. and Schapiro, J.M. (2008) HIV-1 drug resistance mutations: an updated framework for the second decade of HAART. *AIDS Reviews*. 10 (2), 67–84.
- [41] Blankson, J.N., Persaud, D., and Siliciano, R.F. (2002) The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. *Annual Review of Medicine*. 53 557–593.

- [42] Ene, L., Duiculescu, D., and Ruta, S.M. (2011) How much do antiretroviral drugs penetrate into the central nervous system? *Journal of Medicine and Life*. 4 (4), 432–439.
- [43] Eisele, E. and Siliciano, R.F. (2012) Redefining the viral reservoirs that prevent HIV-1 eradication. *Immunity*. 37 (3), 377–388.
- [44] Zamborlini, A., Lehmann-Che, J., Clave, E., Giron, M.-L., Tobaly-Tapiero, J., Roingeard, P., et al. (2007) Centrosomal pre-integration latency of HIV-1 in quiescent cells. *Retrovirology*. 4 (1), 63.
- [45] Pierson, T.C., Zhou, Y., Kieffer, T.L., Ruff, C.T., Buck, C., and Siliciano, R.F. (2002) Molecular characterization of preintegration latency in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of Virology*. 76 (17), 8518–8531.
- [46] Alexaki, A., Liu, Y., and Wigdahl, B. (2008) Cellular reservoirs of HIV-1 and their role in viral persistence. *Current HIV Research*. 6 (5), 388–400.
- [47] Siliciano, R.F. and Greene, W.C. (2011) HIV Latency. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 1 (1), a007096–a007096.
- [48] Jordan, A., Bisgrove, D., and Verdin, E. (2003) HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells in vitro. *The EMBO Journal*. 22 (8), 1868–1877.
- [49] Churchill, M. and Nath, A. (2013) Where does HIV hide? A focus on the central nervous system. *Current Opinion in HIV and AIDS*. 8 (3), 165–169.
- [50] Pierson, T., McArthur, J., and Siliciano, R.F. (2000) Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy. *Annual Review of Immunology*. 18 665–708.
- [51] McArthur, J.C., Steiner, J., Sacktor, N., and Nath, A. (2010) HIV-associated neurocognitive disorders: “mind the gap.” *Annals of Neurology*. NA-NA.
- [52] Davis, L.E., Hjelle, B.L., Miller, V.E., Palmer, D.L., Llewellyn, A.L., Merlin, T.L., et al. (1992) Early viral brain invasion in iatrogenic human immunodeficiency virus infection. *Neurology*. 42 (9), 1736–1739.
- [53] González-Scarano, F. and Martín-García, J. (2005) The neuropathogenesis of AIDS. *Nature Reviews Immunology*. 5 (1), 69–81.
- [54] Gorry, P.R., Ong, C., Thorpe, J., Bannwarth, S., Thompson, K.A., Gatignol, A., et al. (2003) Astrocyte infection by HIV-1: mechanisms of restricted virus replication, and role in the pathogenesis of HIV-1-associated dementia. *Current HIV Research*. 1 (4), 463–473.
- [55] Garden, G.A. (2002) Microglia in human immunodeficiency virus-associated neurodegeneration. *Glia*. 40 (2), 240–251.
- [56] Kramer-Hämmerle, S., Rothenaigner, I., Wolff, H., Bell, J.E., and Brack-Werner, R. (2005) Cells of the central nervous system as targets and reservoirs of the human immunodeficiency virus. *Virus Research*. 111 (2), 194–213.
- [57] Temple, S. (2001) The development of neural stem cells. *Nature*. 414 (6859), 112–117.
- [58] Zhang, J. and Jiao, J. (2015) Molecular Biomarkers for Embryonic and Adult Neural Stem Cell and Neurogenesis. *BioMed Research International*. 2015 1–14.
- [59] Lawrence, D.M.P., Durham, L.C., Schwartz, L., Seth, P., Maric, D., and Major, E.O. (2004) Human immunodeficiency virus type 1 infection of human brain-derived progenitor cells. *Journal of Virology*. 78 (14), 7319–7328.
- [60] Schwartz, L., Civitello, L., Dunn-Pirio, A., Ryschkewitsch, S., Berry, E., Cavert, W., et al. (2007) Evidence of human immunodeficiency virus type 1 infection of nestin-positive neural progenitors in archival pediatric brain tissue. *Journal of Neurovirology*. 13 (3), 274–283.
- [61] Schwartz, L. and Major, E.O. (2006) Neural progenitors and HIV-1-associated central nervous system disease in adults and children. *Current HIV Research*. 4 (3), 319–327.
- [62] Sofroniew, M.V. and Vinters, H.V. (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*. 119 (1), 7–35.

- [63] Brack-Werner, R. (1999) Astrocytes: HIV cellular reservoirs and important participants in neuropathogenesis. *AIDS (London, England)*. 13 (1), 1–22.
- [64] Neumann, M., Felber, B.K., Kleinschmidt, A., Froese, B., Erfle, V., Pavlakis, G.N., et al. (1995) Restriction of human immunodeficiency virus type 1 production in a human astrocytoma cell line is associated with a cellular block in Rev function. *Journal of Virology*. 69 (4), 2159–2167.
- [65] Shapshak, P., Sun, N.C., Resnick, L., Thornthwaite, J.T., Schiller, P., Yoshioka, M., et al. (1991) HIV-1 propagates in human neuroblastoma cells. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 4 (3), 228–237.
- [66] King, J.E., Eugenin, E.A., Buckner, C.M., and Berman, J.W. (2006) HIV tat and neurotoxicity. *Microbes and Infection*. 8 (5), 1347–1357.
- [67] Sabatier, J.M., Vives, E., Mabrouk, K., Benjouad, A., Rochat, H., Duval, A., et al. (1991) Evidence for neurotoxic activity of tat from human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology*. 65 (2), 961–967.
- [68] Kruman, I.I., Nath, A., and Mattson, M.P. (1998) HIV-1 protein Tat induces apoptosis of hippocampal neurons by a mechanism involving caspase activation, calcium overload, and oxidative stress. *Experimental Neurology*. 154 (2), 276–288.
- [69] Kaul, M., Garden, G.A., and Lipton, S.A. (2001) Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. *Nature*. 410 (6831), 988–994.
- [70] Ivey, N.S., MacLean, A.G., and Lackner, A.A. (2009) Acquired immunodeficiency syndrome and the blood-brain barrier. *Journal of Neurovirology*. 15 (2), 111–122.
- [71] Archin, N.M., Liberty, A.L., Kashuba, A.D., Choudhary, S.K., Kuruc, J.D., Crooks, A.M., et al. (2012) Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy. *Nature*. 487 (7408), 482–485.
- [72] Siliciano, J.D., Lai, J., Callender, M., Pitt, E., Zhang, H., Margolick, J.B., et al. (2007) Stability of the latent reservoir for HIV-1 in patients receiving valproic acid. *The Journal of Infectious Diseases*. 195 (6), 833–836.
- [73] Elliott, J.H., Wightman, F., Solomon, A., Ghneim, K., Ahlers, J., Cameron, M.J., et al. (2014) Activation of HIV Transcription with Short-Course Vorinostat in HIV-Infected Patients on Suppressive Antiretroviral Therapy. *PLoS Pathogens*. 10 (11), e1004473.
- [74] Delagrèverie, H.M., Delaugerre, C., Lewin, S.R., Deeks, S.G., and Li, J.Z. (2016) Ongoing Clinical Trials of Human Immunodeficiency Virus Latency-Reversing and Immunomodulatory Agents. *Open Forum Infectious Diseases*. 3 (4), ofw189.
- [75] Gallo, R.C. (2016) Shock and kill with caution. *Science*. 354 (6309), 177–178.
- [76] Lucera, M.B., Tilton, C.A., Mao, H., Dobrowolski, C., Tabler, C.O., Haqqani, A.A., et al. (2014) The histone deacetylase inhibitor vorinostat (SAHA) increases the susceptibility of uninfected CD4+ T cells to HIV by increasing the kinetics and efficiency of postentry viral events. *Journal of Virology*. 88 (18), 10803–10812.
- [77] Grinde, B. (2013) Herpesviruses: latency and reactivation – viral strategies and host response. *Journal of Oral Microbiology*. 5 (1), 22766.
- [78] Ritchie, D., Piekarz, R.L., Blombery, P., Karai, L.J., Pittaluga, S., Jaffe, E.S., et al. (2009) Reactivation of DNA viruses in association with histone deacetylase inhibitor therapy: a case series report. *Haematologica*. 94 (11), 1618–1622.
- [79] Nicoll, M.P., Proença, J.T., and Efstathiou, S. (2012) The molecular basis of herpes simplex virus latency. *FEMS Microbiology Reviews*. 36 (3), 684–705.
- [80] Marban, C., Forouzanfar, F., Ait-Ammar, A., Fahmi, F., El Mekdad, H., Daouad, F., et al. (2016) Targeting the Brain Reservoirs: Toward an HIV Cure. *Frontiers in Immunology*. 7.
- [81] Mousseau, G., Kessing, C.F., Fromentin, R., Trautmann, L., Chomont, N., and Valente, S.T. (2015) The Tat Inhibitor Didehydro-Cortistatin A Prevents HIV-1 Reactivation from Latency. *mBio*. 6 (4), e00465-15.
- [82] Harris, R.S., Hultquist, J.F., and Evans, D.T. (2012) The restriction factors of human immunodeficiency virus. *The Journal of Biological Chemistry*. 287 (49), 40875–40883.

- [83] Kramer-Hämmerle, S., Ceccherini-Silberstein, F., Bickel, C., Wolff, H., Vincendeau, M., Werner, T., et al. (2005) Identification of a novel Rev-interacting cellular protein. *BMC Cell Biology*. 6 (1), 20.
- [84] Vincendeau, M., Kramer, S., Hadian, K., Rothenaigner, I., Bell, J., Hauck, S.M., et al. (2010) Control of HIV replication in astrocytes by a family of highly conserved host proteins with a common Rev-interacting domain (Risp). *AIDS*. 24 (16), 2433–2442.
- [85] Sarkar, I., Hauber, I., Hauber, J., and Buchholz, F. (2007) HIV-1 proviral DNA excision using an evolved recombinase. *Science (New York, N.Y.)*. 316 (5833), 1912–1915.
- [86] Ebina, H., Kanemura, Y., Misawa, N., Sakuma, T., Kobayashi, T., Yamamoto, T., et al. (2015) A High Excision Potential of TALENs for Integrated DNA of HIV-Based Lentiviral Vector. *PLOS ONE*. 10 (3), e0120047.
- [87] Qu, X., Wang, P., Ding, D., Li, L., Wang, H., Ma, L., et al. (2013) Zinc-finger-nucleases mediate specific and efficient excision of HIV-1 proviral DNA from infected and latently infected human T cells. *Nucleic Acids Research*. 41 (16), 7771–7782.
- [88] Ebina, H., Misawa, N., Kanemura, Y., and Koyanagi, Y. (2013) Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Scientific Reports*. 3 2510.
- [89] Snyder, R.O. and Moullier, P., Eds. (2011) Adeno-associated virus: methods and protocols. Humana Press, New York.
- [90] Grimm, D. (2002) Production methods for gene transfer vectors based on adeno-associated virus serotypes. *Methods (San Diego, Calif.)*. 28 (2), 146–157.
- [91] Muzyczka, N. (1992) Use of Adeno-Associated Virus as a General Transduction Vector for Mammalian Cells. in: N. Muzyczka (Ed.), *Viral Expr. Vectors*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelbergpp. 97–129.
- [92] Grimm, D. and Kay, M.A. (2003) From virus evolution to vector revolution: use of naturally occurring serotypes of adeno-associated virus (AAV) as novel vectors for human gene therapy. *Current Gene Therapy*. 3 (4), 281–304.
- [93] Summerford, C. and Samulski, R.J. (1998) Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *Journal of Virology*. 72 (2), 1438–1445.
- [94] Qing, K., Mah, C., Hansen, J., Zhou, S., Dwarki, V., and Srivastava, A. (1999) Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nature Medicine*. 5 (1), 71–77.
- [95] Bartlett, J.S., Wilcher, R., and Samulski, R.J. (2000) Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *Journal of Virology*. 74 (6), 2777–2785.
- [96] Weitzman, M.D. and Linden, R.M. (2011) Adeno-associated virus biology. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. 807 1–23.
- [97] McCarty, D.M. (2008) Self-complementary AAV vectors; advances and applications. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*. 16 (10), 1648–1656.
- [98] Gonçalves, M.A.F.V. (2005) Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virology Journal*. 2 43.
- [99] Ward, P. and Berns, K.I. (1996) In vitro replication of adeno-associated virus DNA: enhancement by extracts from adenovirus-infected HeLa cells. *Journal of Virology*. 70 (7), 4495–4501.
- [100] Liu, Y.L., Wagner, K., Robinson, N., Sabatino, D., Margaritis, P., Xiao, W., et al. (2003) Optimized production of high-titer recombinant adeno-associated virus in roller bottles. *BioTechniques*. 34 (1), 184–189.
- [101] McCarty, D.M., Fu, H., Monahan, P.E., Toulson, C.E., Naik, P., and Samulski, R.J. (2003) Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. *Gene Therapy*. 10 (26), 2112–2118.

- [102] McCarty, D.M., Monahan, P.E., and Samulski, R.J. (2001) Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Therapy*. 8 (16), 1248–1254.
- [103] Wang, Z., Ma, H.-I., Li, J., Sun, L., Zhang, J., and Xiao, X. (2003) Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo. *Gene Therapy*. 10 (26), 2105–2111.
- [104] Wu, J., Zhao, W., Zhong, L., Han, Z., Li, B., Ma, W., et al. (2007) Self-complementary recombinant adeno-associated viral vectors: packaging capacity and the role of rep proteins in vector purity. *Human Gene Therapy*. 18 (2), 171–182.
- [105] Nakai, H., Yant, S.R., Storm, T.A., Fuess, S., Meuse, L., and Kay, M.A. (2001) Extrachromosomal Recombinant Adeno-Associated Virus Vector Genomes Are Primarily Responsible for Stable Liver Transduction In Vivo. *Journal of Virology*. 75 (15), 6969–6976.
- [106] Picanco-Castro, V., Maria de Sousa Russo-Carbolante, E., and Tadeu Covas, D. (2012) Advances in Lentiviral Vectors: A Patent Review. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences*. 6 (2), 82–90.
- [107] Thomas, C.E., Ehrhardt, A., and Kay, M.A. (2003) Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics*. 4 (5), 346–358.
- [108] Douglas, J.T. (2007) Adenoviral vectors for gene therapy. *Molecular Biotechnology*. 36 (1), 71–80.
- [109] Coura, R. dos S. and Nardi, N.B. (2008) A role for adeno-associated viral vectors in gene therapy. *Genetics and Molecular Biology*. 31 (1),.
- [110] Kootstra, N.A. and Verma, I.M. (2003) Gene therapy with viral vectors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 43 413–439.
- [111] Grimm, D. and Zolotukhin, S. (2015) E Pluribus Unum: 50 Years of Research, Millions of Viruses, and One Goal—Tailored Acceleration of AAV Evolution. *Molecular Therapy*. 23 (12), 1819–1831.
- [112] Müller, O.J., Kaul, F., Weitzman, M.D., Pasqualini, R., Arap, W., Kleinschmidt, J.A., et al. (2003) Random peptide libraries displayed on adeno-associated virus to select for targeted gene therapy vectors. *Nature Biotechnology*. 21 (9), 1040–1046.
- [113] Hauber, I., Hofmann-Sieber, H., Chemnitz, J., Dubrau, D., Chusainow, J., Stucka, R., et al. (2013) Highly Significant Antiviral Activity of HIV-1 LTR-Specific Tre-Recombinase in Humanized Mice. *PLoS Pathogens*. 9 (9), e1003587.
- [114] Buchholz, F. and Hauber, J. (2011) In vitro evolution and analysis of HIV-1 LTR-specific recombinases. *Methods (San Diego, Calif.)*. 53 (1), 102–109.
- [115] Mussolino, C., Morbitzer, R., Lütge, F., Dannemann, N., Lahaye, T., and Cathomen, T. (2011) A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic Acids Research*. 39 (21), 9283–9293.
- [116] Perez, E.E., Wang, J., Miller, J.C., Jouvenot, Y., Kim, K.A., Liu, O., et al. (2008) Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nature Biotechnology*. 26 (7), 808–816.
- [117] Holt, N., Wang, J., Kim, K., Friedman, G., Wang, X., Taupin, V., et al. (2010) Human hematopoietic stem/progenitor cells modified by zinc-finger nucleases targeted to CCR5 control HIV-1 in vivo. *Nature Biotechnology*. 28 (8), 839–847.
- [118] Kang, H., Minder, P., Park, M.A., Mesquitta, W.-T., Torbett, B.E., and Slukvin, I.I. (2015) CCR5 Disruption in Induced Pluripotent Stem Cells Using CRISPR/Cas9 Provides Selective Resistance of Immune Cells to CCR5-tropic HIV-1 Virus. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*. 4 e268.
- [119] Li, C., Guan, X., Du, T., Jin, W., Wu, B., Liu, Y., et al. (2015) Inhibition of HIV-1 infection of primary CD4+ T-cells by gene editing of CCR5 using adenovirus-delivered CRISPR/Cas9. *The Journal of General Virology*. 96 (8), 2381–2393.
- [120] Zhu, W., Lei, R., Le Duff, Y., Li, J., Guo, F., Wainberg, M.A., et al. (2015) The CRISPR/Cas9 system inactivates latent HIV-1 proviral DNA. *Retrovirology*. 12 (1),.

- [121] Kaminski, R., Chen, Y., Fischer, T., Tedaldi, E., Napoli, A., Zhang, Y., et al. (2016) Elimination of HIV-1 Genomes from Human T-lymphoid Cells by CRISPR/Cas9 Gene Editing. *Scientific Reports*. 6 22555.
- [122] Hu, W., Kaminski, R., Yang, F., Zhang, Y., Cosentino, L., Li, F., et al. (2014) RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 111 (31), 11461–11466.
- [123] Nagy, A. (2000) Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis (New York, N.Y.: 2000)*. 26 (2), 99–109.
- [124] Gaj, T., Gersbach, C.A., and Barbas, C.F. (2013) ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*. 31 (7), 397–405.
- [125] Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., et al. (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science (New York, N.Y.)*. 339 (6121), 823–826.
- [126] Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., et al. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science (New York, N.Y.)*. 339 (6121), 819–823.
- [127] Hsu, P.D., Scott, D.A., Weinstein, J.A., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V., et al. (2013) DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology*. 31 (9), 827–832.
- [128] Amitai, G. and Sorek, R. (2016) CRISPR–Cas adaptation: insights into the mechanism of action. *Nature Reviews Microbiology*. 14 (2), 67–76.
- [129] Lieber, M.R. (2010) The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway. *Annual Review of Biochemistry*. 79 (1), 181–211.
- [130] Hsu, P.D., Lander, E.S., and Zhang, F. (2014) Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell*. 157 (6), 1262–1278.
- [131] White, M.K., Hu, W., and Khalili, K. (2015) The CRISPR/Cas9 genome editing methodology as a weapon against human viruses. *Discovery Medicine*. 19 (105), 255–262.
- [132] Liao, H.-K., Gu, Y., Diaz, A., Marlett, J., Takahashi, Y., Li, M., et al. (2015) Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells. *Nature Communications*. 6 6413.
- [133] Veldwijk, M. (2002) Development and Optimization of a Real-Time Quantitative PCR-Based Method for the Titration of AAV-2 Vector Stocks. *Molecular Therapy*. 6 (2), 272–278.
- [134] Vincendeau, M., Nagel, D., Brenke, J.K., Brack-Werner, R., and Hadian, K. (2013) Heterogenous nuclear ribonucleoprotein Q increases protein expression from HIV-1 Rev-dependent transcripts. *Virology Journal*. 10 (1), 151.
- [135] Radonić, A., Thulke, S., Mackay, I.M., Landt, O., Siegert, W., and Nitsche, A. (2004) Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 313 (4), 856–862.
- [136] Kabamba-Mukadi, B., Duquenne, A., Henrivaux, P., Musuamba, F., Ruelle, J., Yombi, J.-C., et al. (2010) HIV-1 proviral resistance mutations: usefulness in clinical practice. *HIV Medicine*. 11 (8), 483–492.
- [137] Lee, Y., Messing, A., Su, M., and Brenner, M. (2008) GFAP promoter elements required for region-specific and astrocyte-specific expression. *Glia*. 56 (5), 481–493.
- [138] Lothian, C. and Lendahl, U. (1997) An evolutionarily conserved region in the second intron of the human nestin gene directs gene expression to CNS progenitor cells and to early neural crest cells. *The European Journal of Neuroscience*. 9 (3), 452–462.
- [139] Peden, K., Emerman, M., and Montagnier, L. (1991) Changes in growth properties on passage in tissue culture of viruses derived from infectious molecular clones of HIV-1LA1, HIV-1MAL, and HIV-1ELI. *Virology*. 185 (2), 661–672.
- [140] Samulski, R.J., Chang, L.S., and Shenk, T. (1987) A recombinant plasmid from which an infectious adeno-associated virus genome can be excised in vitro and its use to study viral replication. *Journal of Virology*. 61 (10), 3096–3101.

- [141] Grimm, D., Streetz, K.L., Jopling, C.L., Storm, T.A., Pandey, K., Davis, C.R., et al. (2006) Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature*. 441 (7092), 537–541.
- [142] Senís, E., Fatouros, C., Große, S., Wiedtke, E., Niopek, D., Mueller, A.-K., et al. (2014) CRISPR/Cas9-mediated genome engineering: an adeno-associated viral (AAV) vector toolbox. *Biotechnology Journal*. 9 (11), 1402–1412.
- [143] Janabi, N., Peudenier, S., Héron, B., Ng, K.H., and Tardieu, M. (1995) Establishment of human microglial cell lines after transfection of primary cultures of embryonic microglial cells with the SV40 large T antigen. *Neuroscience Letters*. 195 (2), 105–108.
- [144] DuBridge, R.B., Tang, P., Hsia, H.C., Leong, P.M., Miller, J.H., and Calos, M.P. (1987) Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Molecular and Cellular Biology*. 7 (1), 379–387.
- [145] Gey, G., Coffman, W., and Kubicek, M. (1952) Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research*. 12 (4), 264–265.
- [146] Aden, D.P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., and Knowles, B.B. (1979) Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*. 282 (5739), 615–616.
- [147] Villa, A. (2000) Establishment and Properties of a Growth Factor-Dependent, Perpetual Neural Stem Cell Line from the Human CNS. *Experimental Neurology*. 161 (1), 67–84.
- [148] Rothenaigner, I., Kramer, S., Ziegler, M., Wolff, H., Kleinschmidt, A., and Brack-Werner, R. (2007) Long-term HIV-1 infection of neural progenitor populations. *AIDS (London, England)*. 21 (17), 2271–2281.
- [149] Schneider, M., Tigges, B., Meggendorfer, M., Helfer, M., Ziegenhain, C., and Brack-Werner, R. (2015) A new model for post-integration latency in macroglial cells to study HIV-1 reservoirs of the brain: *AIDS*. 29 (10), 1147–1159.
- [150] Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T., and Sato, J. (1982) Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Research*. 42 (9), 3858–3863.
- [151] Schneider, U., Schwenk, H.U., and Bornkamm, G. (1977) Characterization of EBV-genome negative “null” and “T” cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *International Journal of Cancer*. 19 (5), 621–626.
- [152] Seeger, R.C., Danon, Y.L., Rayner, S.A., and Hoover, F. (1982) Definition of a Thy-1 determinant on human neuroblastoma, glioma, sarcoma, and teratoma cells with a monoclonal antibody. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 128 (2), 983–989.
- [153] Wachinger, M., Kleinschmidt, A., Winder, D., von Pechmann, N., Ludvigsen, A., Neumann, M., et al. (1998) Antimicrobial peptides melittin and cecropin inhibit replication of human immunodeficiency virus 1 by suppressing viral gene expression. *The Journal of General Virology*. 79 (Pt 4) 731–740.
- [154] Kremb, S., Helfer, M., Heller, W., Hoffmann, D., Wolff, H., Kleinschmidt, A., et al. (2010) EASY-HIT: HIV full-replication technology for broad discovery of multiple classes of HIV inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54 (12), 5257–5268.
- [155] Brack-Werner, R., Kleinschmidt, A., Ludvigsen, A., Mellert, W., Neumann, M., Herrmann, R., et al. (1992) Infection of human brain cells by HIV-1: restricted virus production in chronically infected human glial cell lines. *AIDS (London, England)*. 6 (3), 273–285.
- [156] Pontén, J. and Macintyre, E.H. (1968) Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica*. 74 (4), 465–486.

- [157] Messam, C.A., Hou, J., and Major, E.O. (2000) Coexpression of Nestin in Neural and Glial Cells in the Developing Human CNS Defined by a Human-Specific Anti-nestin Antibody. *Experimental Neurology*. 161 (2), 585–596.
- [158] Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 33 (7), 1870–1874.
- [159] Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., and the UGENE team (2012) Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 28 (8), 1166–1167.
- [160] Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74 (12), 5463–5467.
- [161] Kunitz, M. (1950) CRYSTALLINE DESOXYRIBONUCLEASE: I. ISOLATION AND GENERAL PROPERTIES SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR THE MEASUREMENT OF DESOXYRIBONUCLEASE ACTIVITY. *The Journal of General Physiology*. 33 (4), 349–362.
- [162] Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 29 (9), e45.
- [163] Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ Method. *Methods*. 25 (4), 402–408.
- [164] Mardis, E.R. (2008) Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 9 (1), 387–402.
- [165] Lancaster, M.A., Renner, M., Martin, C.-A., Wenzel, D., Bicknell, L.S., Hurles, M.E., et al. (2013) Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*. 501 (7467), 373–379.
- [166] Rothenaigner, I. (2008) HIV-1 Persistenz in humanen neuronalen Progenitorpopulationen, Ludwig Maximilian Universität München, 2008.
- [167] Scholzen, T. and Gerdes, J. (2000) The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology*. 182 (3), 311–322.
- [168] Vincendeau, M. (2010) Influence of exogenous virus HIV-1 on the expression of human endogenous retroviral elements (HERVs), Ludwig Maximilian Universität München, 2010.
- [169] Vance, M.A., Mitchell, A., and Samulski, R.J. (2015) AAV Biology, Infectivity and Therapeutic Use from Bench to Clinic. in: D. Hashad (Ed.), *Gene Ther. - Princ. Chall., InTech*, .
- [170] Kiyota, T., Yamamoto, M., Schroder, B., Jacobsen, M.T., Swan, R.J., Lambert, M.P., et al. (2009) AAV1/2-mediated CNS Gene Delivery of Dominant-negative CCL2 Mutant Suppresses Gliosis, β -amyloidosis, and Learning Impairment of APP/PS1 Mice. *Molecular Therapy*. 17 (5), 803–809.
- [171] Colle, M.-A., Piguet, F., Bertrand, L., Raoul, S., Bieche, I., Dubreil, L., et al. (2010) Efficient intracerebral delivery of AAV5 vector encoding human ARSA in non-human primate. *Human Molecular Genetics*. 19 (1), 147–158.
- [172] Homs, J., Ariza, L., Pagès, G., Udina, E., Navarro, X., Chillón, M., et al. (2011) Schwann cell targeting via intrasciatic injection of AAV8 as gene therapy strategy for peripheral nerve regeneration. *Gene Therapy*. 18 (6), 622–630.
- [173] Foust, K.D., Wang, X., McGovern, V.L., Braun, L., Bevan, A.K., Haidet, A.M., et al. (2010) Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN. *Nature Biotechnology*. 28 (3), 271–274.
- [174] Boutin, S., Monteilh, V., Veron, P., Leborgne, C., Benveniste, O., Montus, M.F., et al. (2010) Prevalence of Serum IgG and Neutralizing Factors Against Adeno-Associated Virus (AAV) Types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the Healthy Population: Implications for Gene Therapy Using AAV Vectors. *Human Gene Therapy*. 21 (6), 704–712.

- [175] Dayton, R.D., Wang, D.B., and Klein, R.L. (2012) The advent of AAV9 expands applications for brain and spinal cord gene delivery. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 12 (6), 757–766.
- [176] Duque, S., Joussemet, B., Riviere, C., Marais, T., Dubreil, L., Douar, A.-M., et al. (2009) Intravenous Administration of Self-complementary AAV9 Enables Transgene Delivery to Adult Motor Neurons. *Molecular Therapy*. 17 (7), 1187–1196.
- [177] Foust, K.D., Nurre, E., Montgomery, C.L., Hernandez, A., Chan, C.M., and Kaspar, B.K. (2008) Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nature Biotechnology*. 27 (1), 59–65.
- [178] Chakrabarty, P., Rosario, A., Cruz, P., Siemieniowski, Z., Ceballos-Diaz, C., Crosby, K., et al. (2013) Capsid Serotype and Timing of Injection Determines AAV Transduction in the Neonatal Mice Brain. *PloS One*. 8 (6), e67680.
- [179] Gray, S.J., Matagne, V., Bachaboina, L., Yadav, S., Ojeda, S.R., and Samulski, R.J. (2011) Preclinical Differences of Intravascular AAV9 Delivery to Neurons and Glia: A Comparative Study of Adult Mice and Nonhuman Primates. *Molecular Therapy*. 19 (6), 1058–1069.
- [180] Samaranch, L., Salegio, E.A., San Sebastian, W., Kells, A.P., Bringas, J., Forsayeth, J., et al. (2013) STRONG CORTICAL AND SPINAL CORD TRANSDUCTION AFTER AAV7 AND AAV9 DELIVERY INTO THE CSF OF NON-HUMAN PRIMATES. *Human Gene Therapy*. 130321054253005.
- [181] Shen, S., Bryant, K.D., Brown, S.M., Randell, S.H., and Asokan, A. (2011) Terminal N-Linked Galactose Is the Primary Receptor for Adeno-associated Virus 9. *Journal of Biological Chemistry*. 286 (15), 13532–13540.
- [182] Bell, C.L., Gurda, B.L., Van Vliet, K., Agbandje-McKenna, M., and Wilson, J.M. (2012) Identification of the Galactose Binding Domain of the Adeno-Associated Virus Serotype 9 Capsid. *Journal of Virology*. 86 (13), 7326–7333.
- [183] Akache, B., Grimm, D., Pandey, K., Yant, S.R., Xu, H., and Kay, M.A. (2006) The 37/67-Kilodalton Laminin Receptor Is a Receptor for Adeno-Associated Virus Serotypes 8, 2, 3, and 9. *Journal of Virology*. 80 (19), 9831–9836.
- [184] Wu, X. and Reddy, D.S. (2012) Integrins as receptor targets for neurological disorders. *Pharmacology & Therapeutics*. 134 (1), 68–81.
- [185] Scott, H. and Panin, V.M. (2014) N-Glycosylation in Regulation of the Nervous System. in: R.K. Yu, C.-L. Schengrund (Eds.), *Glycobiol. Nerv. Syst.*, Springer New York, New York, NYpp. 367–394.
- [186] Bieberich, E. (2014) Synthesis, Processing, and Function of N-glycans in N-glycoproteins. in: R.K. Yu, C.-L. Schengrund (Eds.), *Glycobiol. Nerv. Syst.*, Springer New York, New York, NYpp. 47–70.
- [187] Powell, S.K. and Kleinman, H.K. (1997) Neuronal laminins and their cellular receptors. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 29 (3), 401–414.
- [188] Guitart, K., Loers, G., Buck, F., Bork, U., Schachner, M., and Kleene, R. (2016) Improvement of neuronal cell survival by astrocyte-derived exosomes under hypoxic and ischemic conditions depends on prion protein. *Glia*. 64 (6), 896–910.
- [189] Zincarelli, C., Soltys, S., Rengo, G., and Rabinowitz, J.E. (2008) Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*. 16 (6), 1073–1080.
- [190] Johansson, C.B., Lothian, C., Molin, M., Okano, H., and Lendahl, U. (2002) Nestin enhancer requirements for expression in normal and injured adult CNS. *Journal of Neuroscience Research*. 69 (6), 784–794.
- [191] Josephson, R., Müller, T., Pickel, J., Okabe, S., Reynolds, K., Turner, P.A., et al. (1998) POU transcription factors control expression of CNS stem cell-specific genes. *Development (Cambridge, England)*. 125 (16), 3087–3100.
- [192] Xie, Y., Wang, T., Sun, G.Y., and Ding, S. (2010) Specific disruption of astrocytic Ca²⁺ signaling pathway in vivo by adeno-associated viral transduction. *Neuroscience*. 170 (4), 992–1003.

- [193] Shigetomi, E., Bushong, E.A., Haustein, M.D., Tong, X., Jackson-Weaver, O., Kracun, S., et al. (2013) Imaging calcium microdomains within entire astrocyte territories and endfeet with GCaMPs expressed using adeno-associated viruses. *The Journal of General Physiology*. 141 (5), 633–647.
- [194] Ortinski, P.I., Dong, J., Mungenast, A., Yue, C., Takano, H., Watson, D.J., et al. (2010) Selective induction of astrocytic gliosis generates deficits in neuronal inhibition. *Nature Neuroscience*. 13 (5), 584–591.
- [195] Middeldorp, J. and Hol, E.M. (2011) GFAP in health and disease. *Progress in Neurobiology*. 93 (3), 421–443.
- [196] Restrepo, A., Smith, C.A., Agnihotri, S., Shekarforoush, M., Kongkham, P.N., Seol, H.J., et al. (2011) Epigenetic regulation of glial fibrillary acidic protein by DNA methylation in human malignant gliomas. *Neuro-Oncology*. 13 (1), 42–50.
- [197] Ludwig, E., Silberstein, F.C., van Empel, J., Erfle, V., Neumann, M., and Brack-Werner, R. (1999) Diminished rev-mediated stimulation of human immunodeficiency virus type 1 protein synthesis is a hallmark of human astrocytes. *Journal of Virology*. 73 (10), 8279–8289.
- [198] Bigner, D.D., Bigner, S.H., Pontén, J., Westermarck, B., Mahaley, M.S., Ruoslahti, E., et al. (1981) Heterogeneity of Genotypic and Phenotypic Characteristics of Fifteen Permanent Cell Lines Derived from Human Gliomas: *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 40 (3), 201–229.
- [199] Xie, J., Xie, Q., Zhang, H., Ameres, S.L., Hung, J.-H., Su, Q., et al. (2011) MicroRNA-regulated, systemically delivered rAAV9: a step closer to CNS-restricted transgene expression. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*. 19 (3), 526–535.
- [200] Qiao, C., Yuan, Z., Li, J., He, B., Zheng, H., Mayer, C., et al. (2011) Liver-specific microRNA-122 target sequences incorporated in AAV vectors efficiently inhibits transgene expression in the liver. *Gene Therapy*. 18 (4), 403–410.
- [201] Schnepf, B.C., Clark, K.R., Klemanski, D.L., Pacak, C.A., and Johnson, P.R. (2003) Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. *Journal of Virology*. 77 (6), 3495–3504.
- [202] Smith, R.H. (2008) Adeno-associated virus integration: virus versus vector. *Gene Therapy*. 15 (11), 817–822.
- [203] Gama, L., Abreu, C.M., Shirk, E.N., Price, S.L., Li, M., Laird, G.M., et al. (2017) Reactivation of simian immunodeficiency virus reservoirs in the brain of virally suppressed macaques: *AIDS*. 31 (1), 5–14.
- [204] Rebensburg, S. (2015) Neue Ansätze zur Hemmung der HIV-Replikation, Ludwig Maximilian Universität München, 2015.
- [205] Wang, H., Yang, H., Shivalila, C.S., Dawlaty, M.M., Cheng, A.W., Zhang, F., et al. (2013) One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. *Cell*. 153 (4), 910–918.
- [206] Manjunath, N., Yi, G., Dang, Y., and Shankar, P. (2013) Newer Gene Editing Technologies toward HIV Gene Therapy. *Viruses*. 5 (11), 2748–2766.
- [207] Platt, R.J., Chen, S., Zhou, Y., Yim, M.J., Swiech, L., Kempton, H.R., et al. (2014) CRISPR-Cas9 Knockin Mice for Genome Editing and Cancer Modeling. *Cell*. 159 (2), 440–455.
- [208] Forni, P.E., Scuoppo, C., Imayoshi, I., Taulli, R., Dastrù, W., Sala, V., et al. (2006) High levels of Cre expression in neuronal progenitors cause defects in brain development leading to microencephaly and hydrocephaly. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 26 (37), 9593–9602.
- [209] Bersell, K., Choudhury, S., Mollova, M., Polizzotti, B.D., Ganapathy, B., Walsh, S., et al. (2013) Moderate and high amounts of tamoxifen in α MHC-MerCreMer mice induce a DNA damage response, leading to heart failure and death. *Disease Models & Mechanisms*. 6 (6), 1459–1469.

- [210] Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)*. 337 (6096), 816–821.
- [211] Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F., and Marraffini, L.A. (2013) RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature Biotechnology*. 31 (3), 233–239.
- [212] O'Geen, H., Henry, I.M., Bhakta, M.S., Meckler, J.F., and Segal, D.J. (2015) A genome-wide analysis of Cas9 binding specificity using ChIP-seq and targeted sequence capture. *Nucleic Acids Research*. 43 (6), 3389–3404.
- [213] Grimm, D., Wang, L., Lee, J.S., Schürmann, N., Gu, S., Börner, K., et al. (2010) Argonaute proteins are key determinants of RNAi efficacy, toxicity, and persistence in the adult mouse liver. *The Journal of Clinical Investigation*. 120 (9), 3106–3119.
- [214] Sun, C.-P., Wu, T.-H., Chen, C.-C., Wu, P.-Y., Shih, Y.-M., Tsuneyama, K., et al. (2013) Studies of Efficacy and Liver Toxicity Related to Adeno-Associated Virus–Mediated RNA Interference. *Human Gene Therapy*. 24 (8), 739–750.
- [215] Pattanayak, V., Lin, S., Guilinger, J.P., Ma, E., Doudna, J.A., and Liu, D.R. (2013) High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nature Biotechnology*. 31 (9), 839–843.
- [216] Kucsu, C., Arslan, S., Singh, R., Thorpe, J., and Adli, M. (2014) Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. *Nature Biotechnology*. 32 (7), 677–683.
- [217] Wu, X., Scott, D.A., Kriz, A.J., Chiu, A.C., Hsu, P.D., Dadon, D.B., et al. (2014) Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. *Nature Biotechnology*. 32 (7), 670–676.
- [218] Wang, G., Zhao, N., Berkhout, B., and Das, A.T. (2016) CRISPR-Cas9 Can Inhibit HIV-1 Replication but NHEJ Repair Facilitates Virus Escape. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*. 24 (3), 522–526.
- [219] Wang, Z., Pan, Q., Gendron, P., Zhu, W., Guo, F., Cen, S., et al. (2016) CRISPR/Cas9-Derived Mutations Both Inhibit HIV-1 Replication and Accelerate Viral Escape. *Cell Reports*. 15 (3), 481–489.
- [220] Liang, C., Wainberg, M.A., Das, A.T., and Berkhout, B. (2016) CRISPR/Cas9: a double-edged sword when used to combat HIV infection. *Retrovirology*. 13 (1), 37.
- [221] Chambers, S.M., Qi, Y., Mica, Y., Lee, G., Zhang, X.-J., Niu, L., et al. (2012) Combined small-molecule inhibition accelerates developmental timing and converts human pluripotent stem cells into nociceptors. *Nature Biotechnology*. 30 (7), 715–720.

9 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meiner Doktormutter, Prof. Dr. Ruth Brack-Werner, dafür danken, dass sie mich in ihrer Forschungsgruppe aufgenommen hat und mir ein solch spannendes und vielseitiges Projekt anvertraut hat. Ich konnte mich die letzten Jahre glücklich schätzen eine so tolle fachliche und menschliche Betreuung genießen zu dürfen.

Ich möchte mich auch bei Prof. Dr. Benedikt Grothe bedanken, dass er sich bereit erklärt hat meine Dissertation zu begutachten.

Ein großes Dankeschön geht auch nach Heidelberg zu Dr. Dirk Grimm und seiner ganzen Arbeitsgruppe. Die Kooperation mit euch hat zum wesentlichen Gelingen dieser Arbeit beigetragen und war stets sehr gewinnbringend. Dr. Dirk Grimm möchte ich zusätzlich dafür danken, dass er Teil meines Thesis Committees war und durch anregende Diskussionen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Prof. Dr. Ulrike Protzer möchte ich auch für die Teilnahme an meinem Thesis Committee danken. Durch vielen konstruktiven Input wurde diese Arbeit sehr bereichert.

Dr. Martha Schneider und Dr. Markus Helfer möchte ich ebenfalls danken. Ihr wart die besten Postdocs, die ich mir hätte vorstellen können. Durch eure Unterstützung und Hilfe bei fachlichen Fragen, habt ihr mir immens weitergeholfen.

Nun zu den restlichen Mitgliedern unseres Teams: Stephanie, Johanna, Alex. Ich kann kaum ausdrücken wie wichtig euer Anteil am Gelingen dieser Arbeit war. Dank euch war es mir eine Freude jeden Tag ins Labor zu kommen, auch an Tagen, an denen die Motivation vielleicht mal nicht so hoch war. Das viele Lachen mit euch ist für mich ein ebenso wichtiger Teil dieser Dissertationszeit gewesen wie eure Unterstützung im Laboralltag.

Aber auch allen anderen Mitgliedern unseres Instituts hier draußen möchte ich herzlich danken. Egal ob für die Hilfe bei Experimenten oder das gemütliche Zusammensitzen nach der Arbeit, die Zusammenarbeit mit euch hat mir immer Spaß gemacht. Regina Geiger, Jutta Lang und Karin Eberl möchte ich im Besonderen danken. Dafür, dass ihr dieses Institut immer mit einem Lächeln auf den Lippen am Laufen haltet.

Auch ohne meine Freunde außerhalb des Instituts wäre meine Dissertation nicht möglich gewesen. Dani, Steffi, Gine, Anita und meine Schokostrolche sind nur einige davon. Vielen Dank für eure immerwährende Unterstützung und die zahlreichen Ablenkungen vom Arbeitsalltag.

Wenn auch eher am Ende der Danksagung so habt ihr doch mit den größten Anteil an allem was in meinem Leben passiert: Mama, Papa, Berni. Es ist mir unmöglich in Worte zu fassen wie viel ich euch verdanke und wie wichtig ihr für das Gelingen dieser Arbeit wart. Der Wunsch euch stolz zu machen treibt mich immer weiter an. Eure Unterstützung bedeutet mir mehr als ihr vielleicht manchmal erahnt.

Neben meiner Familie gebührt der größte Dank meinem Mann Andreas. Deine uneingeschränkte Unterstützung, dein Optimismus und dein Tatendrang waren mein wichtigster Antrieb, der letztendlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Du traust mir immer mehr zu als ich mir selbst.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Christine Barbara Kunze, geb. Kammel
Geburtsdatum/-ort	25.01.1988/ Bad Reichenhall
Adresse	An der Biberwiese 11, 82110 Germering
Telefon	0171 4091374
Email	christine.b.kunze@gmail.com
Nationalität	Deutsch
Familienstand	Verheiratet

Ausbildung

02/2013 – 04/2017	Promotion am Institut für Virologie, Helmholtz Zentrum München <u>Titel der Dissertation:</u> Strategien zur Inhibierung der HIV-Reaktivierung in latent infizierten Astrozyten
10/2010 – 10/2012	Masterstudium der Biologie, Universität Regensburg <u>Titel der Masterarbeit am Institut für Pflanzenwissenschaften:</u> Molecular Interactions of the DExD/H-box RNA Helicase UAP56 in <i>Arabidopsis thaliana</i>
10/2007 – 10/2010	Bachelorstudium der Biologie, Universität Regensburg <u>Titel der Bachelorarbeit am Institut für Pflanzenwissenschaften:</u> Characterization of a gene of <i>Arabidopsis thaliana</i> encoding a RNA-helicase
07/1996 – 06/2007	Besuch des Karlsgymnasiums Bad Reichenhall mit Abschluss der allgemeinen Hochschulreife

11 Veröffentlichungen

Posterpräsentationen auf Konferenzen

- 12/2013 International Symposium on Synthetic Biology; Titel: Designing virus vectors for blocking HIV-1 expression and production in brain cells.
- 11/2015 Joint Annual Meeting of DGI and DZIF; Titel: Designing viral vectors for blocking HIV-1 in brain cells.

Vorträge auf Konferenzen

- 03/2014 Annual Meeting of the Society of Virology; Titel: Designing viral vectors for blocking HIV-1 expression and production in brain cells.
- 09/2016 Frontiers of Retrovirology; Titel: Inhibition of HIV-1 reactivation in brain cells by AAV-mediated delivery of CRISPR/Cas9.

Paper

Bolduan S., Koppensteiner H., Businger R., Rebensburg S., **Kunze C.**, Brack-Werner R., Draenert R., Schindler M. (2017). „T cells with low CD2 levels express reduced restriction factors and are preferentially infected in therapy naïve chronic HIV-1 patients.“ Journal of the International AIDS Society. Volume 20. Issue 1.

Kunze C., Kienle E., Börner K., Orschmann T., Rusha E., Schneider M., Radivojkovic-Blagojevic M., Drukker M., Desbordes S., Grimm D., Brack-Werner R. (2017). „Synthetic AAV/CRISPR vectors for blocking HIV-1 expression in persistently infected astrocytes.“ Glia. Volume 66. Issue 2.

12 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, den 15.12.2017

Christine Kunze

(Unterschrift)

Erklärung

Hiermit erkläre ich, *

- ☐ ✓ dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist.
- ☐ ✓ dass ich mich anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg **nicht** unterzogen habe.
- ☐ ~~dass ich mich mit Erfolg der Doktorprüfung im Hauptfach~~
~~..... und in den Nebenfächern~~
~~.....~~
~~bei der Fakultät für~~
~~der..... unterzogen habe.~~
- ☐ ~~dass ich ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der~~
~~Doktorprüfung zu unterziehen.~~

München, den 15.12.2017

Christine Kunze
(Unterschrift)

*) Nichtzutreffendes streichen